

REGIANE LAURIANO BATISTA STRAPASSON

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE *Moquiniastrum polymorphum*
subsp. *floccosum* (ASTERACEAE)**

CURITIBA

2014

REGIANE LAURIANO BATISTA STRAPASSON

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE *Moquiniastrum polymorphum*
subsp. *floccosum* (ASTERACEAE)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Química, Área de Concentração: Química Orgânica, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello

Projeto realizado com auxílio financeiro da Fundação Araucária (processo nº. 15288/2008)

CURITIBA

2014

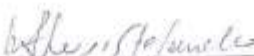
TERMO DE APROVAÇÃO

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE DE *MOQUINIASTRUM POLYMORPHUM SUBSP. FLOCCOSUM*
(ASTERACEAE)

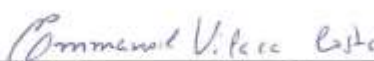
por

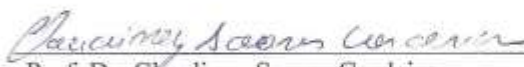
REGIANE LAURIANO BATISTA STRAPASSON

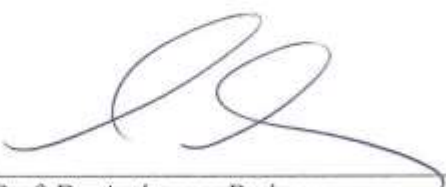
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:


Profª Drª Maria Elida Alves Stefanello
Orientadora
Dep. de Química – UFPR


Prof. Dr. Guilherme Lanza Sasaki
Dep. de Bioquímica - UFPR


Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Dep. de Química – UFS


Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR


Prof. Dr. Andersson Barison
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 21 de agosto de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas que acreditaram e me incentivaram a tornar este sonho, uma realidade, e que são indispensáveis em minha vida!

A minha orientadora: Professora Maria Éli da Alves Stefanello, que foi fundamental para que eu conseguisse realizar este trabalho.

Aos meus pais, João e Raimunda, pelo amor incondicional e por me ensinarem os verdadeiros valores da vida!

Ao meu amado esposo, Leandro, pelo amor verdadeiro, carinho, companheirismo e incentivo. Amo-te!

A minha irmã, Cristiane, que sempre esteve comigo!

Ao meu querido afilhado, Miguel!

Ao meu filho amado Leonardo, que ainda em meu ventre já fez parte desta fase tão importante de minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pelo dom da vida e por me iluminar sempre; e a Nossa Senhora por estar sempre intercedendo ao Senhor por minha vida;

Especialmente, à minha orientadora, que tenho todo orgulho de dizer quem é: Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello, por todo o apoio na condução dos meus trabalhos, desde o meu Mestrado. Sou grata por tudo professora, desde a coleta da planta aos ensinamentos mais complexos da Química. Se no futuro me tornar uma orientadora, me espelharei em ti. Muito obrigada por sua dedicação, confiança, respeito e por ter contribuído para minha formação profissional e ética!

A Universidade Federal do Paraná, minha segunda casa, desde a minha graduação (2004);

A Fundação Araucária pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível;

A CAPES pela bolsa concedida, para que eu tivesse condições de desenvolver esta pesquisa;

Ao CNPQ e FINEP, por contribuírem com o desenvolvimento científico nas Universidades;

Ao Prof. Dr. Armando Carlos Cervi, Departamento de Botânica - UFPR, pela coleta e identificação do material botânico;

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA - UNICAMP), pelos testes de atividade citotóxica;

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador do (CPQBA - UNICAMP), pelos testes de atividade antioxidante;

Aos Professores Dr. Robert Alan Burrow e Dra. Jaísa Fernandes Soares, e ao aluno André Luís Rüdiger pelas análises de Raios-x.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear;

A minha amiga Maria Helena, pelas análises de dicroísmo circular, por todas as vezes que me ajudou no laboratório. Obrigada pelo carinho e apoio!

A amiga Dylamara, pelas análises de CG-EM realizadas na FURB e pelo apoio;

Aos colegas de laboratório, Kahlil e Angelita, pelos espectros de RMN;

Ao meu amigo Alan, pelas dicas preciosas nos métodos cromatográficos;

Ao Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira, pelas diversas vezes em que nos auxiliou com o HPLC;

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, por suas contribuições: Prof. Dr. Andersson Barison, Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro, Prof. Dr. Fábio Simonelli, Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki e Prof. Dr. Emmanoel Vिलाça Costa;

A todos os demais docentes do Departamento de Química que contribuíram para minha formação;

Aos amigos e colegas do Departamento de Química da UFPR, que ao longo de tantos anos, puderam compartilhar conhecimentos;

Ao meu esposo Leandro. Obrigada por cuidar tão bem de mim, por me fazer feliz e sempre me incentivar. Obrigada por assistir tantas prévias, durante todos esses anos, e mesmo não sendo sua área, deu suas contribuições;

Aos meus pais, João e Raimunda, por serem meus maiores exemplos de vida. Obrigada por me ensinarem a fé, o amor, o respeito, a honestidade e a perseverança, e principalmente, por me incentivarem sempre;

Aos meus irmãos, Cristiane e Reinaldo, pelas orações, carinho e incentivo;

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

1. *O Senhor é o meu pastor; de nada terei falta.*
2. *Em verdes pastagens me faz repousar e me conduz a águas tranquilas.*
3. *Restaura-me o vigor. Guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome.*
4. *Mesmo quando eu andar por um vale de trevas e morte, não temerei perigo algum, pois tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me protegem.*
5. *Preparas um banquete para mim à vista dos meus inimigos. Tu me honras, ungindo a minha cabeça com óleo e fazendo transbordar o meu cálice.*
6. *Sei que a bondade e a fidelidade me acompanharão todos os dias da minha vida, e voltarei à casa do Senhor enquanto eu viver.*

(Salmo 23)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	xxiv
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. O novo gênero <i>Moquiniastrum</i>	2
2.2. <i>Moquiniastrum polymorphum</i> (Less.) G. Sancho.....	10
2.3. Relação estrutura-atividade de lactonas sesquiterpênicas com atividades citotóxica, anti-inflamatória e antioxidante.....	20
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. ESTUDO FITOQUÍMICO.....	25
4.1.1 Procedimentos gerais.....	25
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	27
4.1.3 Coleta e identificação do material botânico.....	28
4.1.4 Preparação dos extratos e frações.....	29
4.1.5 Isolamento dos constituintes das flores de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	31
4.1.6 Reação de transesterificação de ésteres triterpênicos.....	32
4.1.7 Reação de esterificação de ácidos graxos.....	32
4.1.8 Isolamento dos constituintes da fração F1C das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	36
4.1.9 Isolamento dos constituintes da fração F2A das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	39
4.1.10 Estudo das frações F1D , F2B e F3 das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	41
4.2. ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	42
4.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	43

4.3.1 – Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH	43
4.3.2 – Ensaio ORAC _{FL}	43
4.3.3 – Quantificação de fenólicos solúveis totais - Ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu (FCR)	44
4.3.4 – Análise estatística.....	44
4.4 – Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 - Identificação dos constituintes das flores de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	48
5.1.1 - Identificação das substâncias M1, M2 e M3	48
5.1.2 - Identificação das substâncias M4, M5 e M6	52
5.1.3 - Identificação das substâncias M7, M8, M9, M10 e M11	56
5.1.4 - Identificação das substâncias M12 e M13	59
5.2 - Identificação dos constituintes das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i>	61
5.2.1 - Identificação das substâncias M18 e M19	61
5.2.2 - Identificação das substâncias M25 e M26	66
5.2.3 - Identificação da substância M27	74
5.2.4 - Identificação da substância M21	77
5.2.5 - Identificação das substâncias M20	81
5.2.6 - Identificação das substâncias M28, M29, M30, M31, M32, M33, M34, M35, M36 e M37	84
5.3. Perfil cromatográfico em CLAE	102
5.4. ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	110
5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	114
6. CONCLUSÃO.....	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

$[\alpha]_D$	Rotação específica
AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)
Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BuOH	Butanol-1
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas
CH_2Cl_2	Diclorometano
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CL	Concentração letal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida sob vácuo
δ	Deslocamento químico
DC	Dicroísmo circular
Dexa	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dupleto
<i>dl</i>	Dupleto largo

<i>dt</i>	Duplo tripleto
<i>dq</i>	Duplo quarteto
DEPT-135	Intensificação dos níveis através da transferência de polarização sem efeito de distorção
EM	Espectrometria de massas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
ESI	Ionização por <i>spray</i> de elétrons
EtOH	Etanol
EtOH : H₂O	Etanol : água
FCR	Folin-ciocalteu
GAE	Ácido gálico equivalente
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear a uma única ligação
Hz	Hertz
IC₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
IR	Índice de retenção
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LD	Longa distância
<i>m</i>	Multipleto
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
ORAC_{FL}	Do inglês <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> , com fluoresceína
<i>q</i>	Quarteto
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³C{¹H}	Ressonância Magnética Nuclear de carbono desacoplado de hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto

s/	Simpleto largo
t	Tripleto
TE	Trolox equivalente
TFA	Ácido trifluoracético
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i>
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UV	Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das espécies brasileiras de <i>Moquiniastrum</i> .	4
Tabela 2 – Relação de espécies de <i>Moquiniastrum</i> estudadas, com exceção de <i>M. polymorphum</i> , e os metabólitos secundários encontrados.	5
Tabela 3 – Relação de trabalhos fitoquímicos e testes de atividades biológicas realizadas com <i>M. polymorphum</i> , e os metabólitos secundários encontrados.	15
Tabela 4 – Rendimento de extratos e frações brutas de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	29
Tabela 5 – Fracionamento da fração CH₂Cl₂ das flores de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	31
Tabela 6 – Fracionamento da fração F1C das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	36
Tabela 7 – Fracionamento da fração F2A das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	39
Tabela 8 – Dados de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (50 MHz, CDCl ₃) de M1 , M2 e M3 .	51
Tabela 9 – Dados de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (50 MHz, CDCl ₃) de M4 , M5 e M6 .	54
Tabela 10 – Dados de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (50 MHz, CDCl ₃) de M7 , M8 , M9 , M10 e M11 .	58
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (400 MHz, CDCl ₃) para M18 e M19 .	65
Tabela 12 – Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (400 MHz, CDCl ₃) para M25 .	70
Tabela 13 – Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (400 MHz, CDCl ₃) para M26 .	73
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (400 MHz, CDCl ₃ +CD ₃ OD) para M27 .	76
Tabela 15 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (400 MHz, CDCl ₃) para M21 e M22 .	80
Tabela 16 – Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) para M20 .	83
Tabela 17 – Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C e HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) para M28 e M29 .	90
Tabela 18 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (600 MHz, CD ₃ OD) para M30 , M32 e M33 .	99
Tabela 19 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (600 MHz, CD ₃ OD) para M31 e M35 .	100
Tabela 20 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD) para M34 , M36 e M37 .	101

Tabela 21 – Atividade citotóxica de extratos e substâncias isoladas das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*. 112

Tabela 22 – Atividade citotóxica (TGI em $\mu\text{mol.L}^{-1}$) das substâncias isoladas **M17**, **M16**, **M22**, **M23**, e **M24**. 113

Tabela 23 – Valores de concentração inibitória (IC_{50}) para o extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* frente ao ensaio DPPH. 115

Tabela 24 – Conteúdo de fenóis totais do extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*. 116

Tabela 25 – Capacidade antioxidante para o extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* frente ao ensaio ORAC. 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Moquiniastrum</i> no Brasil.	3
Figura 2 – Lactonas sesquiterpênicas isoladas do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	6
Figura 3 – Sesquiterpenos isolados do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	6
Figura 4 – Diterpenos isolados do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	7
Figura 5 – Triterpenos isolados do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	8
Figura 6 – Flavonóides isolados do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	9
Figura 7 – Cumarinas, derivados do ácido cafeico, acetileno e aminoácido isolados do gênero <i>Moquiniastrum</i> .	9
Figura 8 – Fotos de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	10
Figura 9 – Imagem da madeira de cambará no Museu Botânico Doutor João Barbosa Rodrigues, no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo, Brasil.	11
Figura 10 – Distribuição geográfica de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> no Brasil.	12
Figura 11 - Lactonas 44 - 49 isoladas de <i>M. polymorphum</i> .	16
Figura 12 – Sesquiterpenos 50 - 54 isolados de <i>M. polymorphum</i> .	16
Figura 13 – Diterpenos 55 – 57 isolados de <i>M. polymorphum</i> .	16
Figura 14 – Triterpenos 58–59 e 62 , e esteroides 60–61 isolados de <i>M. polymorphum</i> .	17
Figura 15 – Flavonoides 63 – 67 isolados de <i>M. polymorphum</i> .	17
Figura 16 – Estruturas das cumarinas 68-70 , das substâncias fenólicas 71-72 , e do iridoide 73 , isolados de <i>M. polymorphum</i> .	18
Figura 17 – Constituintes principais do óleo essencial das flores de <i>M. polymorphum</i> .	18
Figura 18 – Constituintes principais do óleo essencial das raízes de <i>M. polymorphum</i> .	19
Figura 19 – Constituintes principais do óleo essencial da madeira de <i>M. polymorphum</i> .	19
Figura 20 – Ilustração da reação de adição de Michael de um grupo sulfidríla da cisteína com o grupo α -metileno- γ -lactona de lactonas sesquiterpênicas (MERFORT, 2011).	21

Figura 21 – Esqueletos básicos das lactonas sesquiterpênicas.	22
Figura 22 – Lactonas sesquiterpênicas consideradas mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos (MERFORT, 2011).	23
Figura 23 – Estruturas dos triterpenos M1 (acetato de lupeíla), M2 (acetato de taraxasteíla) e M3 (acetato de pseudotaraxasteíla).	49
Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de M1 , M2 e M3 .	49
Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (50 MHz, CDCl_3) da mistura de M1 , M2 e M3 .	50
Figura 26 – Espectro de RMN de DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) da mistura de M1 , M2 e M3 .	50
Figura 27 – Reação geral de transesterificação (MENDES <i>et al.</i> , 1999).	52
Figura 28 – Estruturas dos triterpenos M4 (palmitato de lupeíla), M5 (palmitato de α -amirina) e M6 (palmitato de β -amirina).	52
Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de M4 , M5 e M6 .	53
Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (50 MHz, CDCl_3) da mistura de M4 , M5 e M6 .	53
Figura 31 – Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos obtidos por transesterificação da mistura de M4 , M5 e M6 .	54
Figura 32 – Espectro de massas do componente observado no cromatograma da Figura 31 (p. 54), compatível com palmitato de metila (ADAMS, 2007).	55
Figura 33 – Estruturas dos triterpenos M7 (lupeol), M8 (taraxasterol) e M9 (pseudotaraxasterol), M10 (α -amirina), M11 (β -amirina).	56
Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de M7 , M8 , M9 , M10 e M11 .	56
Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (50 MHz, CDCl_3) da mistura de M7 , M8 , M9 , M10 e M11 .	57
Figura 36 – Reação geral de esterificação de ácidos graxos.	59
Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de M12 e M13 e suas estruturas.	59
Figura 38 – Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos palmitato de metila (TR: 46,056 min.) e estearato de metila (TR: 52,257 min.).	60
Figura 39 – Espectro de massas do componente com TR: 52,257 min.	60
Figura 40 – Estrutura das substâncias M18 (zaluzanin C) e M19 (11,13- β H-diidroestafiatol).	62

Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19 .	63
Figura 42 – Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19 .	63
Figura 43 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19 .	64
Figura 44 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19 .	64
Figura 45 – Principais correlações observadas no Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância das substâncias M18 e M19 .	65
Figura 46 – Estrutura e principais correlações no Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M25 (1 α -hidroxi-11 α ,13-diidroزالuzanin C).	66
Figura 47 – Ilustração da configuração absoluta de M25 , obtida através de Cristalografia de Raios-X.	67
Figura 48 – Dicroísmo circular de M25 .	67
Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução de M25 ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$).	67
Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de M25 .	68
Figura 51 – Ampliação da região de hidrogênios olefínicos e carbinólicos do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de M25 .	68
Figura 52 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) de M25 .	69
Figura 53 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) de M25 .	69
Figura 54 – Ampliação da região olefínica do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) de M25 .	69
Figura 55 – Estrutura de M26 (8 α -hidroxi-11 α ,13-diidroزالuzanin C).	71
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de M26 .	71
Figura 57 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de M26 .	72
Figura 58 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de M26 .	72
Figura 59 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M26 .	73
Figura 60 – Estrutura da substância M27 (11 α ,13-diidroزالuzanin C).	74
Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + CD_3OD) de M27 .	74

Figura 62 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) de M27 .	75
Figura 63 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) de M27 .	75
Figura 64 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M27 .	76
Figura 65 – Estruturas das substâncias M21 (Gochnatolido B) e M22 (Gochnatolido A).	77
Figura 66 – Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de M21 e M22 .	78
Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de M21 .	78
Figura 68 – Ampliações da região olefínica do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de M21 .	78
Figura 69 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) de M21 .	79
Figura 70 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) de M21 .	79
Figura 71 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M21 .	79
Figura 72 – Estrutura da substância M20 (Cafeato de etila).	81
Figura 73 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de M20 .	82
Figura 74 – Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de M20 .	82
Figura 75 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) de M20 .	82
Figura 76 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) de M20 .	83
Figura 77 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M20 .	83
Figura 78 – Unidade cafeoíla (LEE <i>et al.</i> , 2010).	84
Figura 79 – Unidade do ácido quínico esterificado (LEE <i>et al.</i> , 2010).	84
Figura 80 – Estruturas das substâncias M28 (clorogenato de metila), M29 (clorogenato de etila), M30 (3,4-dicafeoilquinato de etila), M31 (3,5-dicafeoilquinato de metila), M32 (3,5-dicafeoilquinato de etila), M33 (4,5-dicafeoilquinato de etila), M34 (ácido 3,5-dicafeoilquínico), M35 (3,4-dicafeoilquinato de metila), M36 (ácido 4,5-dicafeoilquínico), e M37 (ácido 3,4-dicafeoilquínico).	86

Figura 81 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de M29 .	86
Figura 82 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de M29 .	87
Figura 83 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de M29 .	87
Figura 84 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de M29 .	87
Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M28 .	88
Figura 86 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de M28 .	88
Figura 87 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de M28 .	88
Figura 88 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de M28 e M29 .	89
Figura 89 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de M30 .	91
Figura 90 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de M30 .	91
Figura 91 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de M30 .	91
Figura 92 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M31 .	92
Figura 93 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de M31 .	92
Figura 94 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de M31 .	92
Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de M32 .	93
Figura 96 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de M32 .	93
Figura 97 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de M32 .	93
Figura 98 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de M33 .	94
Figura 99 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de M33 .	94
Figura 100 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de M33 .	94
Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M35 .	95
Figura 102 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de M35 .	95

Figura 103 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de M35 .	95
Figura 104 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M34 .	96
Figura 105 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de M34 .	96
Figura 106 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de M34 .	96
Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M36 .	97
Figura 108 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de M36 .	97
Figura 109 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de M36 .	97
Figura 110 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de M37 .	98
Figura 111 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de M37 .	98
Figura 112 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de M37 .	98
Figura 113 – Cromatograma analítico de F1 (método 3, p. 28), em 254 nm.	103
Figura 114 – Cromatogramas das lactonas diméricas (M16 , M21 - M24) das cascas do tronco de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> (método 3, p. 28), em 254 nm.	104
Figura 115 – Espectros de UV das lactonas diméricas (M16 , M21 - M24).	104
Figura 116 – Cromatograma em 212 nm e espectro de UV da lactona sesquiterpênica M17 das cascas do tronco de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	105
Figura 117 – Cromatograma em 212 nm e espectro de UV da mistura de lactonas sesquiterpênicas M18+M19 das cascas do tronco de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	105
Figura 118 – Perfil analítico de F1 (CH_2Cl_2) (método 3, p. 28) em 212 nm, com a identificação dos constituintes isolados.	106
Figura 119 – Comparação dos perfis cromatográficos das frações em CH_2Cl_2 das cascas, das flores e das folhas de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> (método 3, p.28), em 254 nm.	107
Figura 120 – Cromatograma analítico de F1C , F1D , F2A e F2B (método 2, p. 27), em 325 nm.	108
Figura 121 – Cromatograma analítico de F2 (método 2, p. 27), em 325 nm.	109
Figura 122 – Cromatograma analítico de F3 (método 2, p. 27), em 325 nm.	109

Figura 123 – Estrutura da doxorrubicina.	111
Figura 124 – Estrutura do AAPH (2,2'-Azobis-(2-amidinopropano).	116
Figura 125 – Estrutura da fluoresceína.	117
Figura 126 – Estrutura da quercetina.	117
Figura 127 – Estrutura do trolox.	117

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fluxograma de obtenção dos extratos e frações brutas das flores de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	30
Esquema 2 – Fluxograma de obtenção dos extratos e frações brutas das cascas do tronco de <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	30
Esquema 3 – Reação de transesterificação de ésteres triterpênicos.	33
Esquema 4 – Reação de esterificação de ácidos graxos.	34
Esquema 5 – Fracionamento da fração CH₂Cl₂ das flores de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	35
Esquema 6 – Fracionamento da fração F1C das cascas do tronco de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	38
Esquema 7 – Fracionamento da fração F2A das cascas do tronco de <i>M. polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> .	40
Esquema 8 – Substâncias identificadas na fração F1D .	41
Esquema 9 – Substâncias identificadas na fração F2B .	41
Esquema 10 – Substâncias identificadas na fração F3 .	41

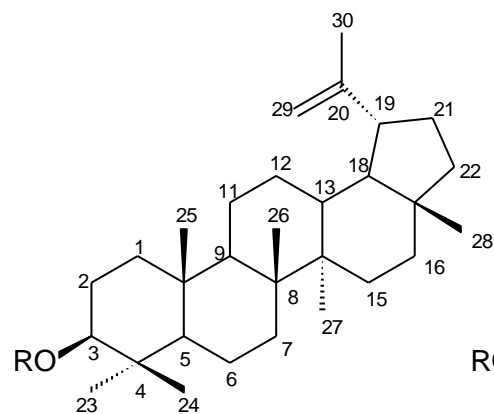
RESUMO

Moquiniastrum polymorphum (Less.) G. Sancho (sinonímia, *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabrera), conhecida popularmente como cambará é uma árvore nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai. É empregada na medicina popular contra doenças respiratórias, tais como asma, bronquite, tosse e resfriado. Lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e cumarinas foram previamente isolados desta espécie. Este trabalho descreve o estudo fitoquímico das flores e das frações mais polares das cascas do tronco de *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* (Cabrera) G. Sancho, além do perfil cromatográfico de extratos e frações, e a avaliação de sua atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células tumorais. O material botânico foi coletado em Curitiba, PR, secado e, extraído com hexano e etanol, sucessivamente. O extrato etanólico foi fracionado por partição com solventes e por técnicas cromatográficas. Os constituintes químicos foram identificados por técnicas espectrométricas e comparação com dados da literatura. O estudo fitoquímico das flores levou à identificação de 15 substâncias conhecidas, sendo 11 triterpenos: lupeol (**M7**), acetato de lupeíla (**M1**), palmitato de lupeíla (**M4**), taraxasterol (**M8**), acetato de taraxasteíla (**M2**), pseudotaraxasterol (**M9**), acetato de pseudotaraxasteíla (**M3**), α -amirina (**M10**), palmitato de α -amirina (**M5**), β -amirina (**M11**), palmitato de β -amirina (**M6**); dois esteróides: sitosterol (**M14**) e estigmasterol (**M15**), e dois ácidos graxos: ácido palmítico (**M12**) e esteárico (**M13**). O estudo fitoquímico das flores levou à identificação de dois novos guaianolídeos, 1α -hidroxi- $11\alpha,13$ -diidrozaluzanin C (**M25**) e $11,13$ - α H-diidroestafiatol (**M19**), além de 22 substâncias conhecidas: os esteróides sitosterol (**M14**) e estigmasterol (**M15**); cinco guaianolídeos diméricos: gochnatiolido A (**M22**), gochnatiolido B (**M21**), gochnatiolido C (**M16**), 8-hidroxigochnatiolido A (**M23**), e 8-hidroxigochnatiolido C (**M24**); quatro guaianolídeos: zaluzanin C (**M18**), 11α H, 13 -diidrozaluzanin C (**M17**), 8α -hidroxi- $11\alpha,13$ -diidrozaluzanin C (**M26**), e $11\alpha,13$ -diidroglucozaluzanin C (**M27**); e 11 derivados do ácido cafeico: cafeato de etila (**M20**), clorogenato de metila (**M28**), clorogenato de etila (**M29**), 3,4-dicafeoilquinato de etila (**M30**), 3,5-dicafeoilquinato de metila (**M31**), 3,5-dicafeoilquinato de etila (**M32**), 4,5-dicafeoilquinato de etila (**M33**), 3,4-dicafeoilquinato de metila (**M35**), ácido 3,5-dicafeoilquínico (**M34**); ácido 4,5-dicafeoilquínico (**M36**) e ácido 3,4-dicafeoilquínico (**M37**). Estas substâncias fenólicas estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie. Os guaianolídeos diméricos de *Moquiniastrum polymorphum* apresentaram significativa atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas de glioma, melanoma, mama, rim, ovário, próstata e colon. As frações das cascas do tronco apresentaram elevada atividade antioxidante.

ABSTRACT

Moquiniastrum polymorphum (Less.) G. Sancho (synonymy *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabrera), known popularly as cambará is a tree native to South America, occurring in Brazil, Paraguay, Argentina and Uruguay. It has been used in folk medicine against respiratory diseases such as asthma, bronchitis, cough and cold. Sesquiterpene lactones, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, flavonoids, phenolic compounds and, coumarins were previously isolated from this specie. This work describes the phytochemical study of flowers and polar fractions of the the trunk bark of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* (Cabrera) G. Sancho beyond the chromatographic profiles of extracts and fractions, and evaluation of their *in vitro* cytotoxic activity against tumor cells lines. The botanical material was collected in Curitiba, Paraná. It was dried, powdered and extracted with hexane and ethanol, successively. The ethanolic extract was fractionated by partition with solvents using chromatographic techniques. The chemical constituents were identified by spectrometric methods, and comparison with literature data. Phytochemical study of the flowers led to the identification of eleven triterpenes: lupeol (**M7**), lupeyl acetate (**M1**), lupeyl palmitate (**M4**), taraxasterol (**M8**), taraxasteryl acetate (**M2**), pseudotaraxasterol (**M9**), pseudotaraxasterol acetate (**M3**), α -amyrin (**M10**), α -amyryl palmitate (**M5**), β -amyrin (**M11**) and β -amyryl palmitate (**M6**), along with sitosterol (**M14**), stigmasterol (**M15**), and palmitic (**M12**) and stearic acids (**M13**). The phytochemical study of the polar fractions of the trunk bark afforded two new guaianolides, 1 α -hydroxy-11 α ,13-dihydrozaluzanin C (**M25**) and 11,13- α H-dihydroestafiatol (**M19**), together with 22 known compounds: two steroids, sitosterol (**M14**) and stigmasterol (**M15**); five dimeric guaianolides: gochnatiolide A (**M22**), gochnatiolide B (**M21**), gochnatiolide C (**M16**), 8-hydroxygochnatiolide A (**M23**), and 8-hydroxygochnatiolide C (**M24**); four guaianolides: zaluzanin C (**M18**), 11 α H-13-dihydrozaluzanin C (**M17**), 8 α -hidroxy-11 α ,13-dihydrozaluzanin C (**M26**), and 11 α ,13-dihydroglucozaluzanin C (**M27**); and 11 caffeic acid derivatives: ethyl caffeate (**M20**), methyl chlorogenate (**M28**), ethyl chlorogenate (**M29**), ethyl 3,4-dicaffeoyl quinate (**M30**), methyl 3,5-dicaffeoyl quinate (**M31**), ethyl 3,5-dicaffeoyl quinate (**M32**), ethyl 4,5-dicaffeoyl quinate (**M33**), methyl 3,4-dicaffeoyl quinate (**M35**), 3,5-dicaffeoyl quinic acid (**M34**), 4,5-dicaffeoyl quinic acid (**M36**), and 3,4-dicaffeoyl quinic acid (**M37**). These phenolic substances are being reported for the first time in the specie. This work also showed that dimeric guaianolides of *Moquiniastrum polymorphum* show significant cytotoxic activity against human cancer cell lines of glioma, melanoma, breast, kidney, ovary, prostate and colon. The trunk bark fractions showed high antioxidant activity.

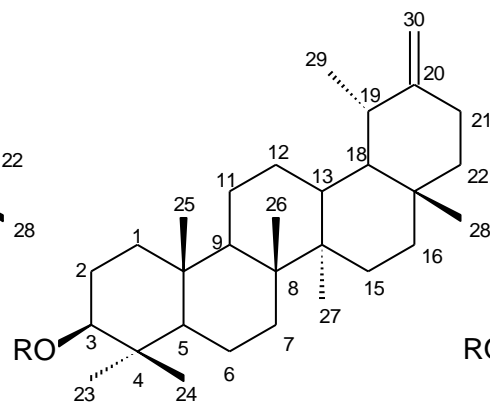
ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



M1 R = COCH₃

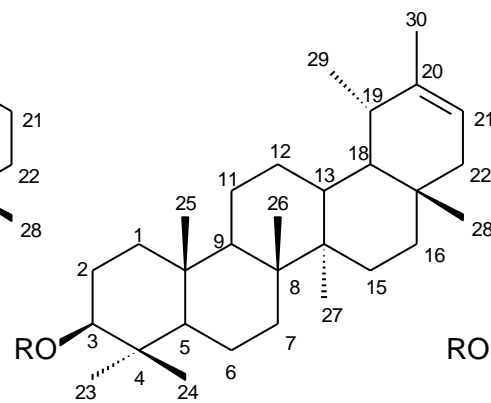
M4 R = CO(CH₂)₁₄CH₃

M7 R = H



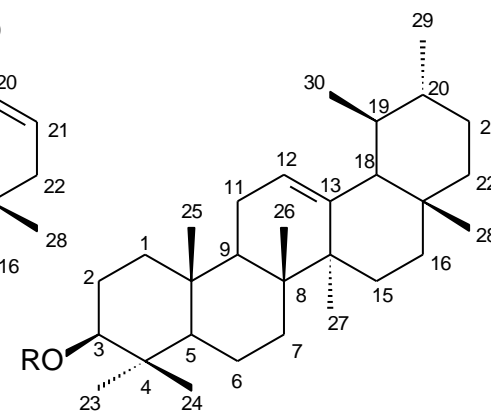
M2 R = COCH₃

M8 R = H



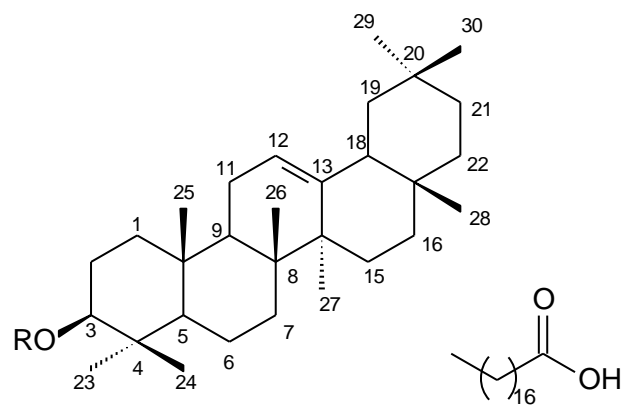
M3 R = COCH₃

M9 R = H



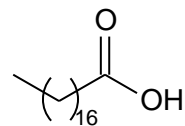
M5 R = CO(CH₂)₁₄CH₃

M10 R = H



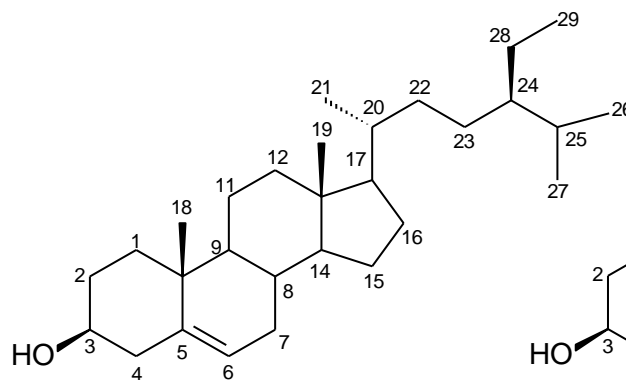
M6 R = CO(CH₂)₁₄CH₃

M11 R = H

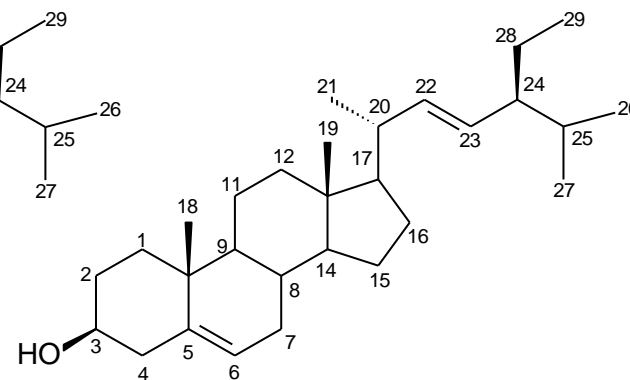


M12 n = 14

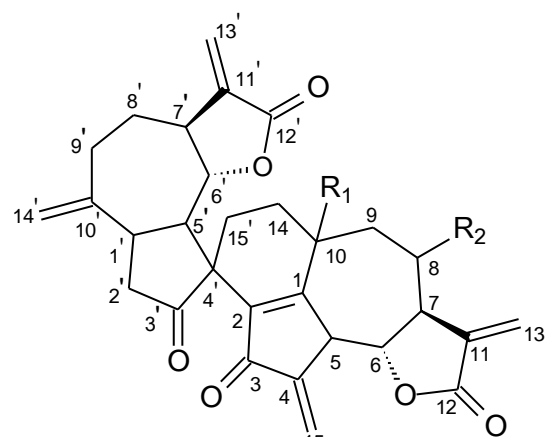
M13 n = 16



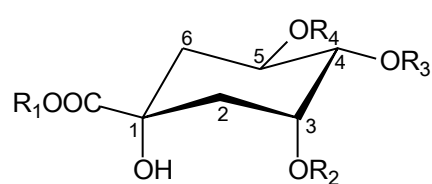
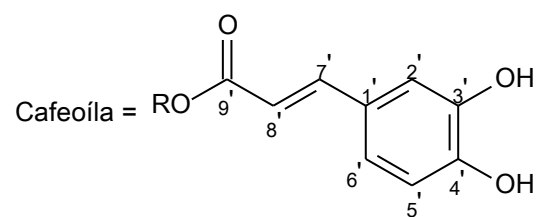
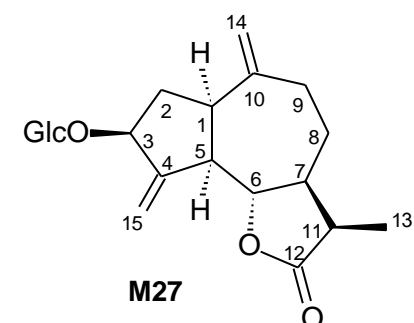
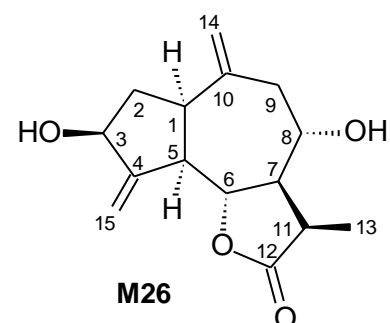
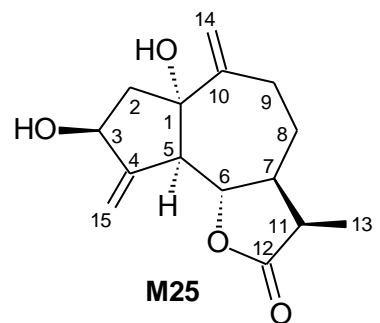
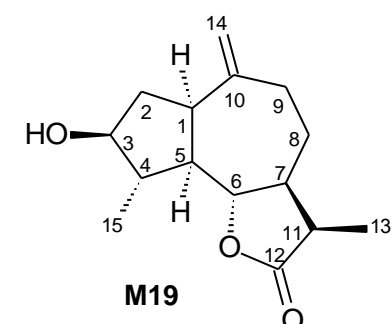
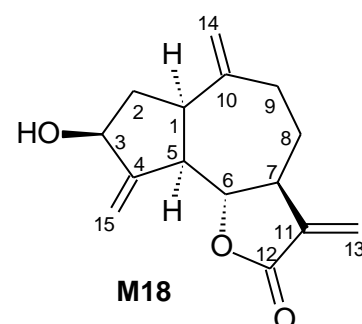
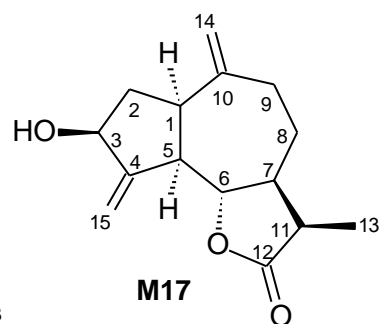
M14



M15



	R ₁	R ₂
M16	H	H
M21	β-OH	H
M22	α-OH	H
M23	α-OH	β-OH
M24	H	α-OH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
M28	Metila	H	H	Cafeoíla
M29	Etila	H	H	Cafeoíla
M30	Etila	Cafeoíla	Cafeoíla	H
M31	Metila	Cafeoíla	H	Cafeoíla
M32	Etila	Cafeoíla	H	Cafeoíla
M33	Etila	H	Cafeoíla	Cafeoíla
M34	H	Cafeoíla	H	Cafeoíla
M35	Metila	Cafeoíla	Cafeoíla	H
M36	H	H	Cafeoíla	Cafeoíla
M37	H	Cafeoíla	Cafeoíla	H

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para a prevenção e cura de enfermidades está presente em todas as sociedades humanas, sendo o único recurso terapêutico de muitas civilizações. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maioria dos países, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que, grande parte da população mundial se utiliza deste recurso natural para suprir necessidades básicas de saúde (FIRMO *et al.*, 2011; RODRIGUES & AMARAL, 2012).

A partir de 1940, descobertas de importantes antibióticos oriundos de produtos naturais aliadas ao desenvolvimento de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, foram as principais causas da redução do uso de plantas medicinais. Até 1970, a química sintética revelou ser a grande protagonista na produção de diversos fármacos utilizados nas diferentes enfermidades humanas, como por exemplo, os anti-histamínicos antergan e benadril; o anti-hipertensivo hidrazalina; o antidepressivo tricíclico imipramina; e anti-inflamatórios não esteroidais, como a indometacina, entre outros. No entanto, a partir das últimas décadas, o desenvolvimento de técnicas modernas, para o isolamento e identificação de substâncias, além do surgimento de uma mudança nos paradigmas dos povos ocidentais, fez com que os produtos naturais ressurgissem novamente como uma importante fonte para química medicinal (YUNES & CEQUINEL, 2012; SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

No conhecimento popular está a base da utilização das drogas vegetais como recurso terapêutico. No entanto, existe uma grande preocupação pela comunidade científica com relação à eficácia, confiabilidade e segurança do uso da maioria das plantas medicinais, já que, grande parte não apresenta estudos científicos quanto às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas.

É importante ressaltar o crescente aumento nas pesquisas etnofarmacológicas que, juntamente com os estudos nas áreas de farmacologia, química, bioquímica, toxicologia, biologia molecular, podem levar à validação da utilização das plantas medicinais (YUNES & CEQUINEL, 2012; FIRMO *et al.*, 2011).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, representando, portanto, um grande potencial para indústria farmacêutica. Há registros de que os primeiros médicos portugueses que vieram para o nosso país, diante da escassez dos medicamentos utilizados na Europa, perceberam a importância dos remédios de origem vegetal utilizados pelos povos indígenas. Através das grandes navegações foi possível a descoberta de novas terras e nações, deixando como legado ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina (RODRIGUES & AMARAL, 2012).

Alguns exemplos importantes de plantas medicinais que fazem parte da biodiversidade brasileira são: *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Spilanthes acmella* (jambu), *Tabebuia* spp. (lapacho), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), e *Copaifera* spp. (copaíba) (GURIB-FAKIM, 2006). Contudo, ainda há um enorme número de plantas extremamente promissoras, sem qualquer investigação fitoquímica, ou apenas com estudos preliminares. De um total aproximado de 500 mil espécies de plantas catalogadas mundialmente, considera-se que, em relação ao uso médico, apenas cinco mil espécies foram estudadas (RATES, 2001). No Brasil, com cerca de 44 mil espécies vegetais (incluindo algas, fungos, samambaias e plantas superiores), estima-se que apenas 0,4% da nossa flora foi investigada (GURIB-FAKIM, 2006; RODRIGUES & AMARAL; 2012; FLORA DO BRASIL, 2014).

As plantas medicinais constituem, sem dúvida, um recurso terapêutico alternativo amplamente utilizado pela população e, com crescente aceitação junto à comunidade médica. Naturalmente é necessário a utilização de plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança. Sob este aspecto, os produtos naturais continuarão, por muito tempo, tendo relevância fundamental na sociedade moderna, pois, mesmo com o crescente aumento na produção de medicamentos sintéticos, é principalmente no reino vegetal que se encontra a possibilidade de descoberta de novos agentes terapêuticos. Neste contexto, destaca-se a importância de estudos fitoquímicos guiados por ensaios biológicos, que permitem direcionar o trabalho experimental para o isolamento de moléculas com atividade biológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O novo gênero *Moquiniastrum*

Asteraceae é a maior família do grupo das Angiospermas (plantas floríferas), compreendendo cerca de 1300 gêneros e 23.000 espécies. O grande número de espécies e a diversidade morfológica das asteráceas sempre foram um desafio para os taxonomistas. Ao longo do tempo várias classificações foram propostas para as espécies da família. O advento da biologia molecular trouxe novas mudanças na circunscrição dos gêneros, tribos e subfamílias de Asteraceae, agora baseada em dados genéticos (PANERO & FUNK, 2008). O gênero *Gochnatia* foi um dos que sofreram alterações. Na década de 70, uma revisão das espécies da tribo Gochnatinae levou a redefinição do

gênero *Gochnatia*, o qual passou a incluir espécies anteriormente classificadas nos gêneros *Moquinia* e *Spadonia*. Nessa classificação o gênero agrupava 70 espécies em seis seções, sendo uma delas denominada *Moquiniastrium*. Estudos recentes de filogenia molecular mostraram que as espécies da seção *Moquiniastrium* eram muito próximas entre si e, diferentes das demais espécies do gênero, o que determinou a sua elevação ao nível de gênero (CABRERA & KLEIN, 1973; SANCHO *et al.*, 2013).

Como atualmente circunscrito, esse novo gênero possui 21 espécies, de arbustos, subarbustos e, ocasionalmente árvores, com importantes centros de dispersão no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (SANCHO *et al.*, 2013).

No Brasil, são encontradas 19 espécies distribuídas nos principais domínios fitogeográficos que incluem o Cerrado (Minas Gerais, Bahia, Goiás, Paraná, São Paulo), Pampa (Rio Grande do Sul) e também as regiões de Mata Atlântica (do Nordeste ao Sul do país) (Figura 1, p. 3; Tabela 1, p. 4) (CABRERA & KLEIN, 1973, SANCHO *et al.*, 2013, 2014).

Na região sul ocorrem 10 espécies: *M. argyreum*, *M. barrosoae*, *M. cinereum*, *M. cordatum*, *M. mollissimum*, *M. paniculatum*, *M. polymorphum*, *M. ramboi*, *M. ramboi* e *M. velutinum* (SANCHO *et al.*, 2014).



Figura 1 – Distribuição geográfica de espécies do gênero *Moquiniastrium* no Brasil (SANCHO *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Relação das espécies brasileiras de *Moquiniastrum* (SANCHO *et al.*, 2013, 2014).

ESPÉCIE	OCORRÊNCIA
1. <i>Moquiniastrum argyreum</i> (Dusén ex Malme) G. Sancho	PR
2. <i>Moquiniastrum barrosoae</i> (Cabrera) G. Sancho	PR, MG, SP, GO, MS, MT e MA
3. <i>Moquiniastrum blanchetianum</i> (DC.) G. Sancho	ES, MG, GO, BA, CE e PE
4. <i>Moquiniastrum cinereum</i> (Hook. & Arn.) G. Sancho	RS, PR, SP
5. <i>Moquiniastrum cordatum</i> (Less.) G. Sancho	RS
5.1. <i>Moquiniastrum cordatum</i> var. <i>mollissimum</i> (Hassler) G. Sancho	RS
6. <i>Moquiniastrum densicephalum</i> (Cabrera) G. Sancho	SP, RJ, MG, DF e BA
7. <i>Moquiniastrum discolor</i> (Baker) G. Sancho	MG
8. <i>Moquiniastrum floribundum</i> (Cabrera) G. Sancho	SP, RJ, MG, GO, MS e BA
9. <i>Moquiniastrum gardneri</i> (Baker) G. Sancho	GO
10. <i>Moquiniastrum hatschbachii</i> (Cabrera) G. Sancho	MG
11. <i>Moquiniastrum haumanianum</i> (Cabrera) G. Sancho	MS
12. <i>Moquiniastrum mollissimum</i> (Malme) G. Sancho	RS
13. <i>Moquiniastrum oligocephalum</i> (Gardner) G. Sancho	PE, CE e BA
14. <i>Moquiniastrum paniculatum</i> (Less) G. Sancho	PR, SP, RJ, MG, GO e BA
15. <i>Moquiniastrum polymorphum</i> (Less.) G. Sancho	RS, SC, PR, SP, RJ, MG, ES, MS, GO, BA
15.1. <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>ceanothifolium</i> (Less.) G. Sancho	RS, SC, PR, SP e MG
15.2. <i>Moquiniastrum polymorphum</i> subsp. <i>floccosum</i> (Cabrera) G. Sancho	RS, SC, PR, SP e MG
16. <i>Moquiniastrum pulchrum</i> (Cabrera) G. Sancho	SP
17. <i>Moquiniastrum ramboi</i> (Cabrera) G. Sancho	RS, SC e MS
18. <i>Moquiniastrum sordidum</i> (Less.) G. Sancho	RS, SC, PR e SP
19. <i>Moquiniastrum velutinum</i> (Bong.) G. Sancho	SC, PR, SP, RJ e MG

Dentre as espécies desse novo gênero, quase a metade já teve algum estudo químico. A tabela 2 (p. 5) relaciona as espécies já estudadas, excluindo *M. polymorphum*, que será abordada na seção seguinte. Pode-se notar que o gênero é caracterizado pela produção de substâncias de diversas classes, incluindo lactonas sesquiterpênicas (Figura 2, p. 6), sesquiterpenos (Figura 3, p. 6), diterpenos (Figura 4, p. 7), triterpenos (Figura 5, p. 8), flavonoides (Figura 6, p. 9), cumarinas, derivados do ácido cafeico, acetileno e aminoácido (Figura 7, p. 9).

Tabela 2 - Relação de espécies de *Moquiniastrium* estudadas, com excessão de *M. polymorphum*, e os metabólitos secundários encontrados.

Espécie	Metabólitos secundários	Referências
<i>Moquiniastrium argentinum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia argentina</i>)	Flavonóides: 7-O-metil-luteolina (32) e hispidulina (33). Cumarinas: capensina (37); fraxidina (38) e fraxetina (39).	GARCIA & GUERREIRO, 1988
<i>Moquiniastrium blanchetianum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia blanchetiana</i>)	Triterpenos: lupeol (26); acetato de lupeíla (27); ácido betulínico (28); dammareno diol (30) e 3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (31). Flavonóides: 3-β-O-β-D-glicosil-canferol (34); tilirosídeo (35). Aminoácido: 4-hidroxi-N-metilprolina (42).	BOHLMANN <i>et al.</i> , 1981; LIMA <i>et al.</i> , 2003.
<i>Moquiniastrium bolivianum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia rusbyana</i>)	Triterpenos: 3β-hidroxi-lup-12-eno (29). Lactonas: zaluzanin C (1). Éster do ácido cafeico: cafeato de metila (40). Acetileno: Tridec-1-eno-3,5,7,9,11-pentaino (43)	BOHLMANN & ZDERO, 1979.
<i>Moquiniastrium haumanianum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia haumaniana</i>)	Triterpenos: ácido oleanólico (20); ácido ursólico (21) e α-amirina (22).	CATALAN <i>et al.</i> , 2003.
<i>Moquiniastrium paniculatum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia paniculata</i>)	Sesquiterpenos: 10,11-epoxi-9α-angeloiloxi-3,7,11-trimetil-1,4,6-dodecatrien-3-ol (9); α-curcumen-12,15-dial (10) e 12-hidroxi-α-curcumen-15-al (11). Diterpenos: 6α-hidroxi-17-fenilacetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (12); 6α-hidroxi-17-acetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (13); 6α-18-diidroxi-17-acetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (14); 6α-18-diidroxi-17-fenilacetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (15); 6α-18-diidroxi-17-acetoxi-kolavenoato (16); 6α-18-diidroxi-17-fenilacetoxi-kolavenoato (17); gochnatol-17-O-acetato (18) e gochnat-15-óico-17-O-fenilacetato (19). Lactonas: deidrocostuslactona (2); costunolido (3); β-ciclocostunolido (4); gochnatiolido A (7); gochnatiolido B (8). Flavonóide: 7[(3-metil-2-buten-1-il)oxi]-3β,4',5-triidroxi-flavanona (36).	BOHLMANN <i>et al.</i> , 1983.
<i>Moquiniastrium pulchrum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia pulchra</i>)	Triterpenos: β-amirina (23); taraxerol (24); taraxerato de etila (25); lupeol (26) e acetato de lupeíla (27). Éster do ácido cafeico: ácido 3,5-O-dicafeoilquinico (41).	LUCARINI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Moquiniastrium velutinum</i> (Sinonímia: <i>Gochnatia velutina</i>)	Lactonas: α-ciclocostunolido (5); diidro-β-ciclocostunolido (6).	TOMASSINI & GILBERT, 1972.

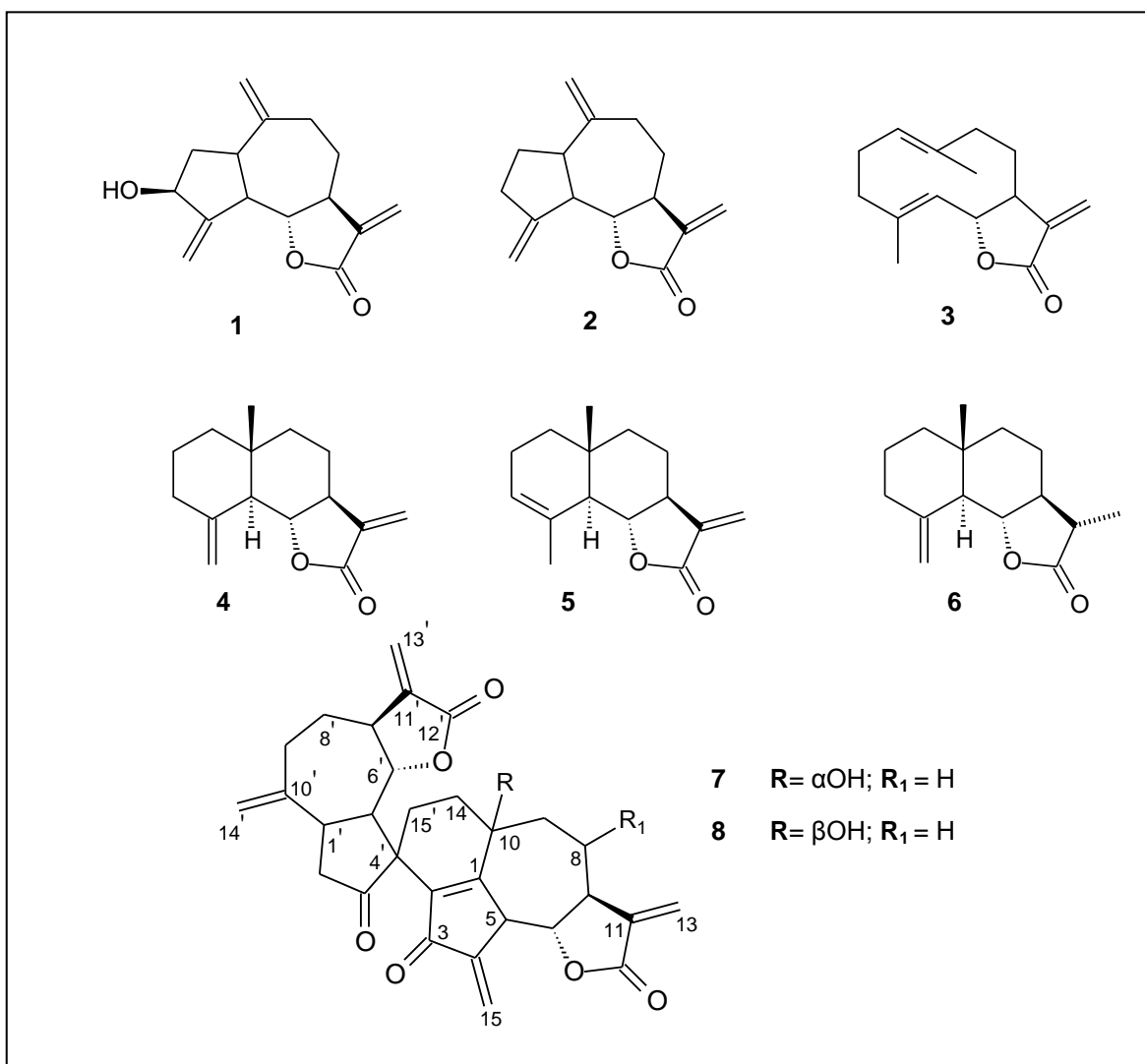


Figura 2 - Lactonas sesquiterpênicas isoladas do gênero *Moquiniastrium*.

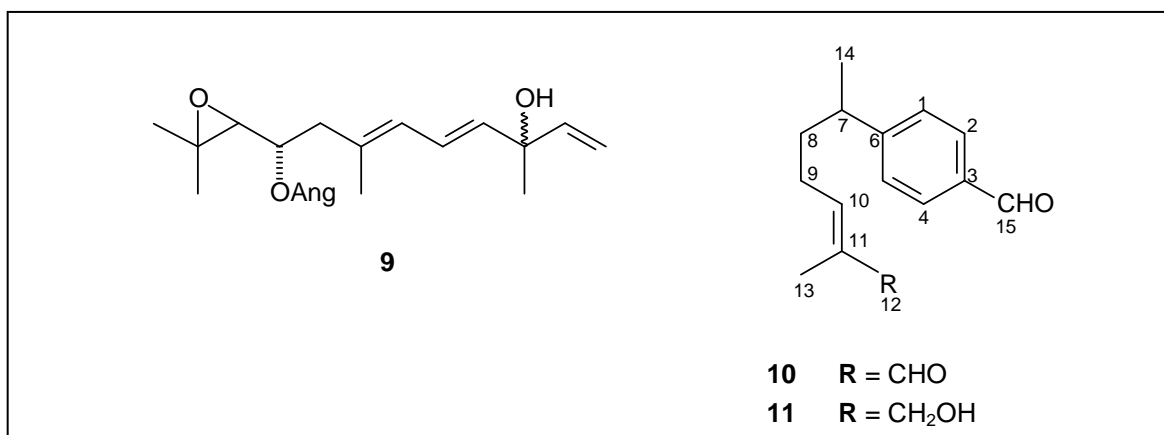


Figura 3 - Sesquiterpenos isolados do gênero *Moquiniastrium*.

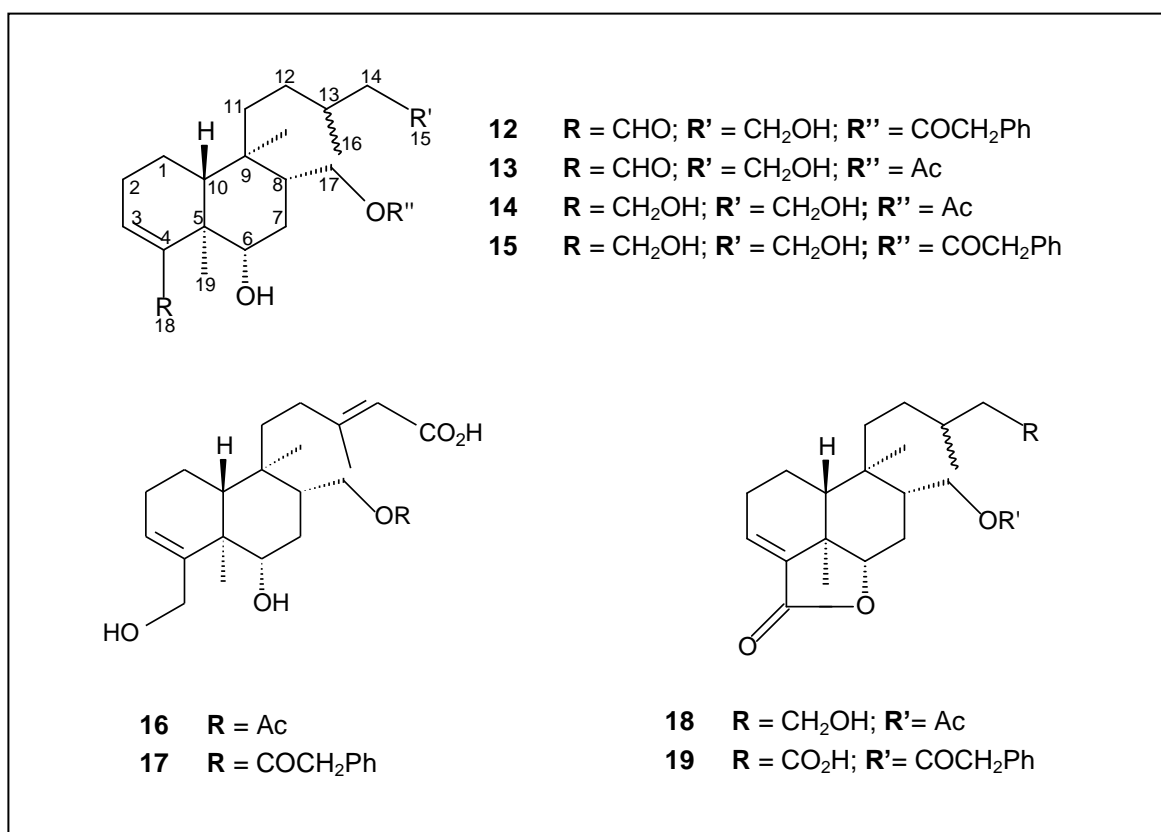


Figura 4 - Diterpenos isolados do gênero *Moquiniastrum*.

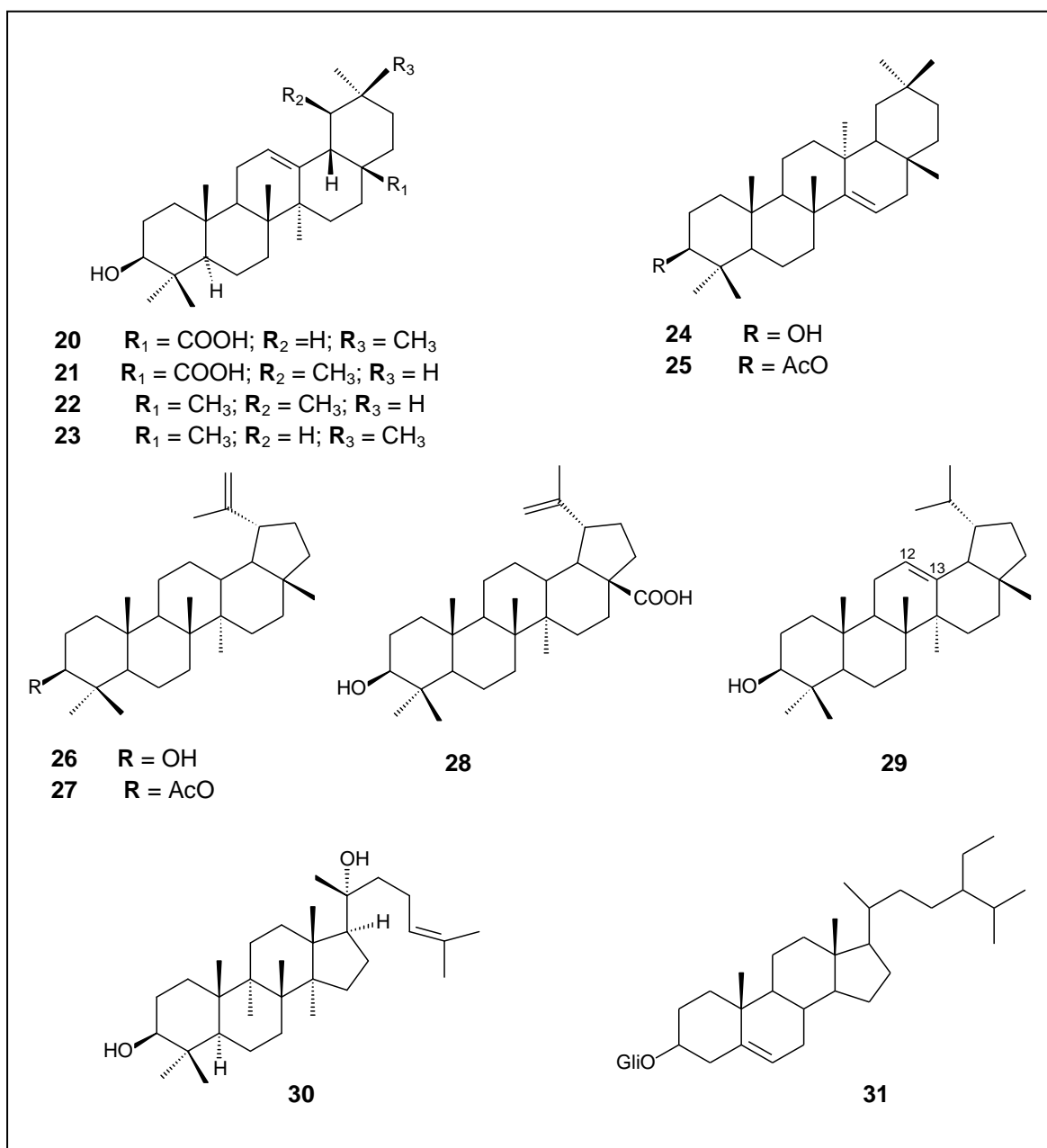


Figura 5 - Triterpenos isolados do gênero *Moquiniastrum*.

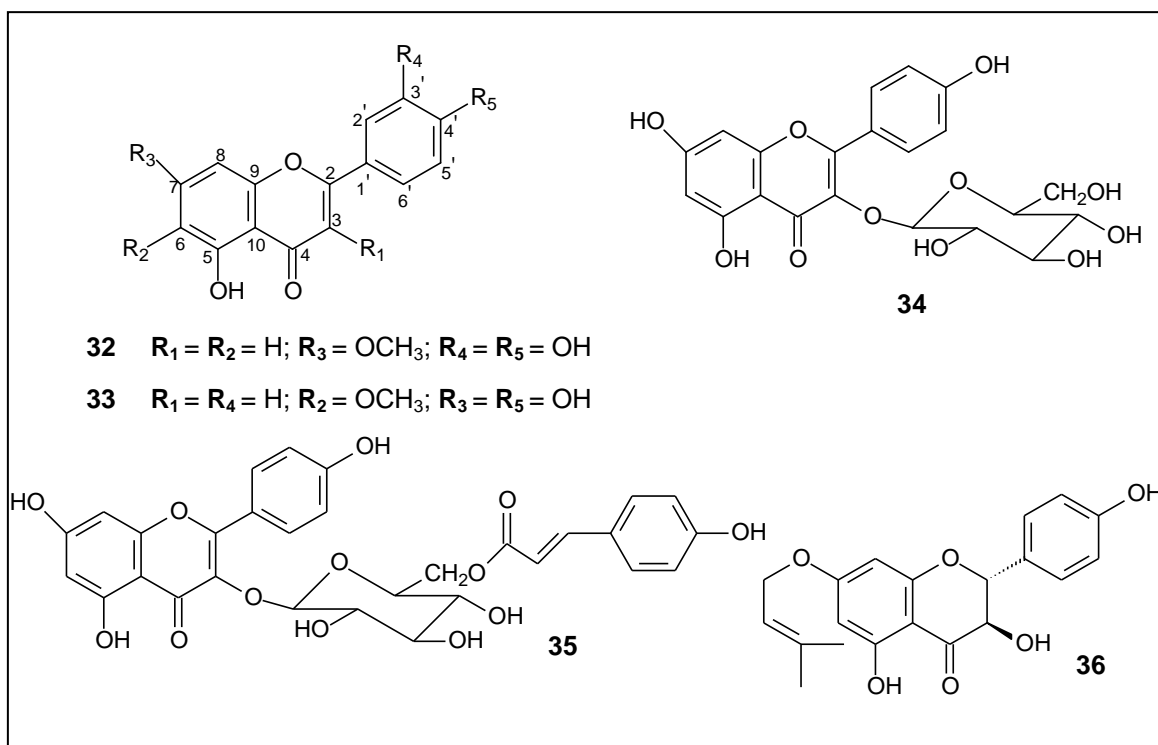


Figura 6 - Flavonóides isolados do gênero *Moquiniastrum*.

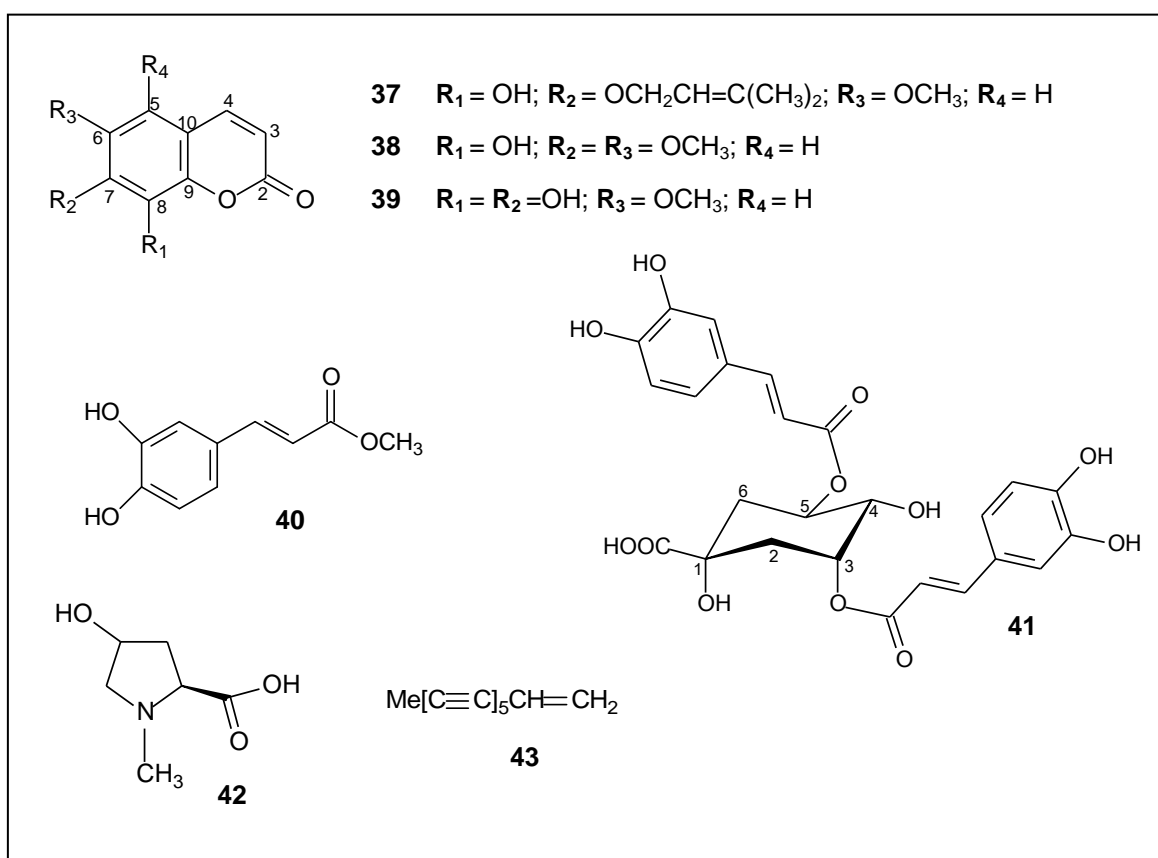


Figura 7 – Cumarinas, derivados do ácido cafeico, acetileno e aminoácido.

2.2. *Moquiniastrum polymorphum* (Less.) G. Sancho

Moquiniastrum polymorphum (Less.) G. Sancho, anteriormente denominada *Moquinia polymorpha* (Less.) DC ou *Gochnatia polymorpha* (Cabrera) (CABRERA & KLEIN, 1973), é uma espécie arbórea (Figura 8, p. 10), conhecida no Brasil como cambará, cambará-da-folha-grande, cambará-do-mato, cambará-guaçu ou ainda, candeia (LIMA *et al.*, 2007; SCHLEMPER *et al.*, 2011).



Figura 8 – Fotos de *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum*. A – árvore; B – flores e folhas; C – capítulos florais; D – folhas e tronco (Fonte: STRAPASSON, R. L. B., 2014).

A espécie normalmente floresce durante os meses de setembro a fevereiro, frutificando em seguida, sendo que suas flores são agregadas em pequenos capítulos. Desenvolve-se bem em condições ruins, como terrenos arenosos e pouco férteis. Atua

como espécie secundária inicial, colonizando áreas abertas; tolera geadas fracas, podendo ser encontrada às margens de rios (DURIGAN *et al.*, 2002). Por isso, é uma espécie muito recomendada para reconstrução de ecossistemas degradados.

As características da madeira do cambará justificam as suas principais aplicações, uma vez que é considerada própria para obras imersas, pontes, esquadrias, curvas para a construção naval, rodas d'água, moirões de cerca, que resistem dezenas de anos devido a sua grande resistência ao apodrecimento, seu cerne compacto, e durabilidade ao ar livre e condições adversas (Figura 9, p. 11). Além disso, a planta apresenta características ornamentais, sendo bastante empregada no paisagismo em geral (CABRERA & KLEIN, 1973; LORENZI, 2002).



Figura 9 – Imagem da madeira de cambará no Museu Botânico Doutor João Barbosa Rodrigues, no Jardim Botânico de São Paulo, em São Paulo, Brasil. Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Cambará\(árvore\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cambará(árvore)), acesso em 07/07/2014.

Na região Sul do Brasil, a população utiliza as folhas, flores e cascas do tronco no preparo de chás ou xaropes contra resfriados, tosses e outras doenças respiratórias (MORS *et al.*, 2000; GARLET & IRGANG, 2001; BUENO *et al.*, 2005; ARAMBARRI *et al.*, 2008).

São reconhecidas duas subespécies dessa planta: *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *ceanothifolium* (Less.) G. Sancho e *Moquiniastrum polymorphum* subsp.

floccosum (Cabrera) G. Sancho, com diferentes áreas de distribuição. A subespécie *ceanothifolium* ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, além de Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina. Já a subespécie *floccosum* é exclusiva do Brasil, sendo encontrada nas regiões de Mata Atlântica no Sul e Sudeste, principalmente, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 10, p. 12) (SANCHO *et al.*, 2014).

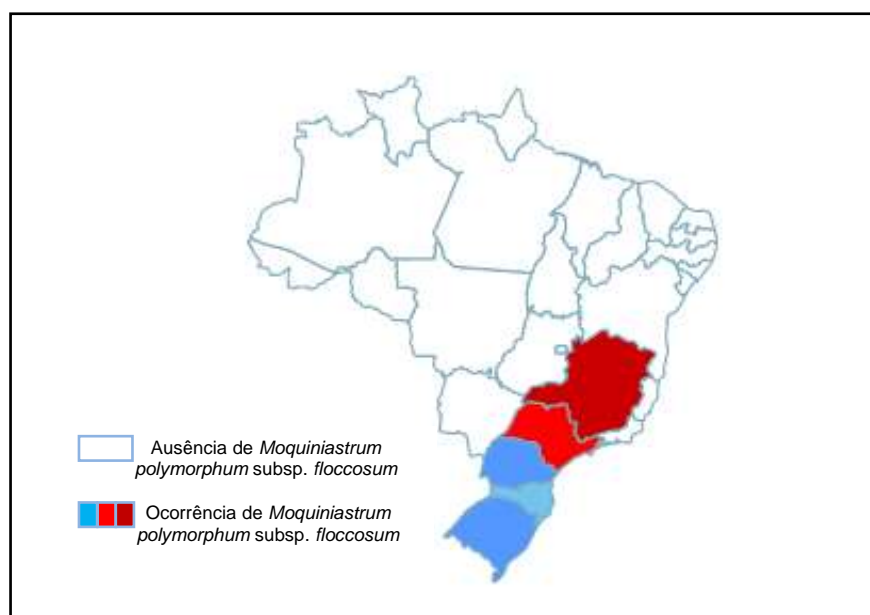


Figura 10 - Distribuição geográfica de *Moquiniastrium polymorphum* subsp. *floccosum* no Brasil (SANCHO *et al.*, 2014).

A tabela 3 (p. 15) relaciona os estudos fitoquímicos e/ou biológicos que foram conduzidos anteriormente com *Moquiniastrium polymorphum*. Pode-se observar que foram isoladas 37 substâncias, de várias classes. Algumas dessas substâncias foram isoladas também de outras espécies do gênero, mas a maioria foi registrada até agora somente em *M. polymorphum*. (Figuras 11-16, p. 16 - 18). A presença de substâncias fenólicas nos extratos da madeira foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (LIMA *et al.*, 2007).

É importante destacar os trabalhos sobre a atividade biológica da espécie. O primeiro estudo químico, guiado por testes farmacológicos, foi realizado por Moreira e colaboradores (2000), que avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das frações das folhas obtidas por partição (CH_2Cl_2 , AcOEt, BuOH e fase aquosa residual). Foi possível verificar que a atividade anti-inflamatória, no modelo de edema de pata, estava concentrada na fração em AcOEt das folhas de *M. polymorphum* (ativa na concentração de 150 mg/Kg). Com base nestes resultados, os autores realizaram um estudo fitoquímico com esta fração polar, a qual forneceu os flavonoides **64**, **65** e **66**, e os

ácidos **71** e **72**. Essas substâncias foram consideradas responsáveis pela atividade observada. O aminoácido 4-hidroxi-*N*-metil-prolina (**42**), isolado da fase aquosa, apresentou menor atividade do que a mistura de substâncias fenólicas (MOREIRA *et al.*, 2000).

Outro estudo mostrou que o extrato hidroalcoólico das folhas possui atividade antiespasmódica. O autor sugere que este resultado pode justificar o uso desta planta para o tratamento de doenças gastrointestinais espasmogênicas (SCHLEMPER *et al.*, 2011).

O uso na medicina popular, associado à carência de dados biológicos sobre *M. polymorphum* despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa. Em um estudo preliminar, foram avaliadas as atividades citotóxica e antimicrobiana, de extratos e frações de folhas, cascas e ramos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*. No ensaio de letalidade contra *Artemia salina* nenhuma amostra mostrou citotoxicidade, sugerindo que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. No ensaio de atividade antimicrobiana, a maior atividade foi observada no extrato em CH₂Cl₂ das cascas do tronco que inibiu o crescimento de várias cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, e *Candida albicans* (STEFANELLO *et al.*, 2006^b). Posteriormente, as duas substâncias principais dessa fração (a lactona **44** e o triterpeno **58**) foram testadas frente aos mesmos microrganismos, mas não apresentaram atividade (STRAPASSON, 2010).

Em um novo estudo, os extratos e frações das cascas do tronco foram testados para as atividades vasorrelaxante e anti-inflamatória.

A atividade vasorrelaxante foi avaliada *in vitro*, usando anéis de aorta isolada de ratos. O extrato EtOH e as frações obtidas por partição (CH₂Cl₂, AcOEt e BuOH) apresentaram atividade, que foi maior na fração em CH₂Cl₂. O seu fracionamento cromatográfico foi realizado, resultando no isolamento e identificação de triterpenos (**58**, **59**), esteroides (**60**, **61**), e lactonas sesquiterpênicas (**7**, **8**, **44**, **46**, **47**, **48**, **49**). Nenhuma substância pura foi avaliada neste ensaio (STRAPASSON, 2010).

Paralelamente, a atividade anti-inflamatória foi testada em modelos de inflamação em camundongos. O tratamento por via oral com o extrato EtOH reduziu de maneira significativa o edema, a migração leucocitária e também a inflamação pleural causada pela carragenina, na concentração de 30 mg/Kg. Este resultado foi superior àquele previamente descrito para as folhas (MOREIRA *et al.*, 2000). As frações em CH₂Cl₂ e BuOH foram as mais ativas. A atividade da fração em CH₂Cl₂ foi atribuída à lactona 11 α H,13-diidrozaluzanin C (**44**), que foi ativa na concentração de 10 mg.Kg⁻¹ (PIORNEDO *et al.*, 2011). Os constituintes da fração butanólica ativa não foram identificados nesta etapa.

Os resultados promissores da atividade anti-inflamatória abriram a possibilidade de ser desenvolvido um fitoterápico, para o combate de doenças respiratórias de origem inflamatória como asma e bronquite, contendo o extrato das cascas do tronco de *M. polymorphum*. Para tanto é necessário demonstrar que a planta não é tóxica, nem causa teratogênese na dose recomendada. O primeiro estudo desse tipo foi recentemente concluído, e mostrou a ausência de toxidez e teratogênese do extrato etanólico total das cascas em ratas prenhes. Embora outros testes sejam necessários, esse resultado aponta para a segurança do uso dessa planta durante a gravidez (DAVID *et al.*, 2014).

Além dos estudos fitoquímicos, os óleos essenciais das flores, raízes e madeira foram analisados. O óleo das flores é bastante complexo, contendo monoterpenos, sesquiterpenos, substâncias aromáticas e alifáticas, e apresenta variação sazonal. Os principais constituintes foram: *trans*-óxido de linalol (**75**, 1,0-8,3%), *E*-nerolidol (**76**, 9,5-20,4%), fenilacetaldéido (**77**, 3,9-14,6%), eugenol (**78**, 0,5-17,9%), undecanal (**79**, 7,5-7,6%), tricosano (**80**, 3,0-12,0%), e pentacosano (**81**, 1,7-5,6%) (Figura 17, p. 18). Por outro lado, no óleo das raízes foram identificados apenas sesquiterpenos, sendo os principais: β -bisaboleno (**82**, 31,0%), β -bisabolol (**83**, 21,5%), (6*R*,7*R*)-bisabolona (**84**, 8,6%), e globulol (**85**, 10,4%) (Figura 18, p. 19) (STEFANELLO *et al.*, 2006^a). O óleo da madeira também contém sesquiterpenos, principalmente α -curcumeno (**86**, 6,98%), α -diidroturnerona (**87**, 9,39%), β -diidroturnerona (**88**, 12,76%), e cedranol (**89**, 18,84%), além de uma substância aromática identificada como 1-ciclopentil-3-[2,4-dimetilfenil]-propano (**90**, 18,56%) (Figura 19, p. 19) (LIMA *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Relação dos estudos fitoquímicos e biológicos realizados com *M. polymorphum*.

Local de coleta (parte)	Extrato (fração)	Substâncias identificadas	Atividades biológicas	Referência
SP, Brasil (C)	Hexano	Lactona: deidrocostuslactona (2). Triterpeno: acetato de bauerenila (58). Lactonas: deidrocostuslactona (2); costunolido (3); gochnatiolido A (7); gochnatiolido B (8); gochnatiolido C (46); 8 β -hidroxi-gochnatiolido C (47); 8- β -hidroxigochnatiolido A (48) e bis-11 α ,13-diidro-gochnatiolido A (49). Lactona: santamarina (45). Diterpenos: ent-3 α ,19-diacetoxi-12 α ,15 β -diidroxicaur-16-eno (55); ent-17,19-diacetoxi-3 α ,16 α -diidroxicaurano (56). Triterpenos: taraxerol (24) e cicloart-25-eno-3 β -22 α -diol (62). Flavonóides: genkwanina (63) e desmetoxi-centaureidina (67). Aminoácido: 4-hidroxi-N-metil-prolina (42). Flavonóides: 3-O-metilquercetina (64); rutina (65) e hiperosídeo (66). Substâncias fenólicas: ácidos cafeico (71) e clorogênico (72). Triterpeno: ácido oleanólico (20). Diterpeno: 3 α ,19 α -diidroxicaur-16-eno (57). Cumarinas: purpurasolol (68), purpurasol (69) e 6,7-dimetoxi-8-(2,3-diidroxi-3-metil-butanoxi)-cumarina (70). iridóide - loliolido (73).	-	FARIAS <i>et al.</i> , 1984
Paraguai (PA, R)	EtOH (CHCl ₃)		-	BOHLMANN <i>et al.</i> , 1986
SP, Brasil (PA, R)	CH ₂ Cl ₂		-	SACILOTTO <i>et al.</i> , 1997
RS, Brasil (F)	EtOH (AcOEt, H ₂ O)		Anti-inflamatória	MOREIRA <i>et al.</i> , 2000
Paraguai (F)	CHCl ₃		-	CATALAN <i>et al.</i> , 2003
PR, Brasil (C, F, RM)	Éter de petróleo, CH ₂ Cl ₂ , EtOH	-	Antimicrobiana. Inativo contra <i>Artemia salina</i> .	STEFANELLO <i>et al.</i> , 2006 ^b
MG, Brasil (M)	MeOH:H ₂ O, Acetona:H ₂ O	Teor de fenóis totais	-	LIMA <i>et al.</i> , 2007.
PR, Brasil (C)	EtOH (CH ₂ Cl ₂)	Lactonas: gochnatiolido A (7); gochnatiolido B (8); 11 α H,13-diidrozaluzanin C (44); gochnatiolido C (46); 8 β -hidroxi-gochnatiolido C (47); e 8- β -hidroxigochnatiolido A (48). Triterpenos e esteróides: acetato de bauerenila (58), bauerenona (59), sitosterol (60) e estigmasterol (61).	Antimicrobiana, anti-inflamatória e vasorrelaxante	STRAPASSON, 2010; PIORNEDO <i>et al.</i> , 2011.
SC, Brasil (F)	MeOH: H ₂ O	-	Antiespasmódica	SCHLEMPER <i>et al.</i> , 2011.
PR, Brasil (C)	EtOH	-	Ausência de toxidez e teratogênese	DAVID <i>et al.</i> , 2014.

Parte da planta coletada: **C** = cascas do tronco; **F** = folhas; **M** = madeira; **PA** = partes aéreas; **R** = raízes; **RM** = ramos.

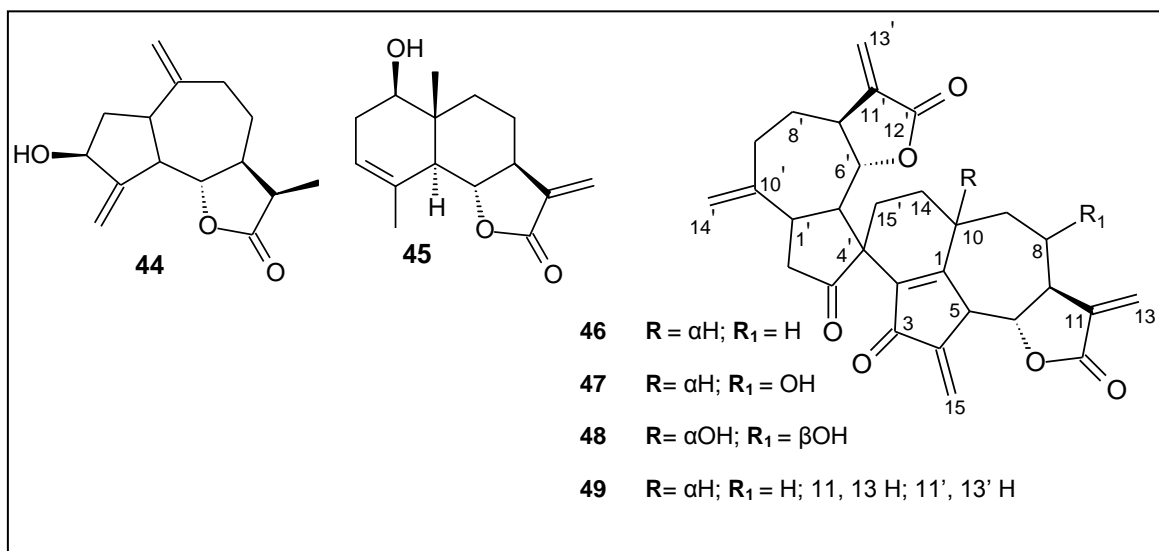


Figura 11 – Estruturas das lactonas **44-49** isoladas de *M. polymorphum*.

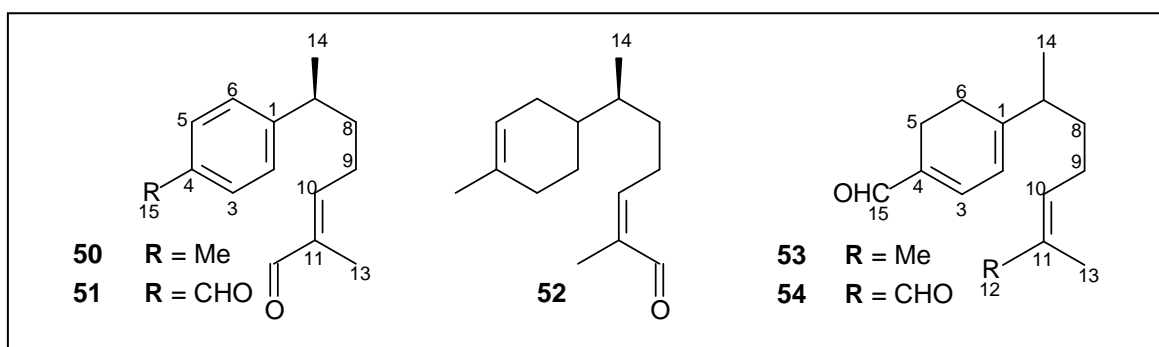


Figura 12 – Estruturas dos sesquiterpenos **50-54** isolados de *M. polymorphum*.

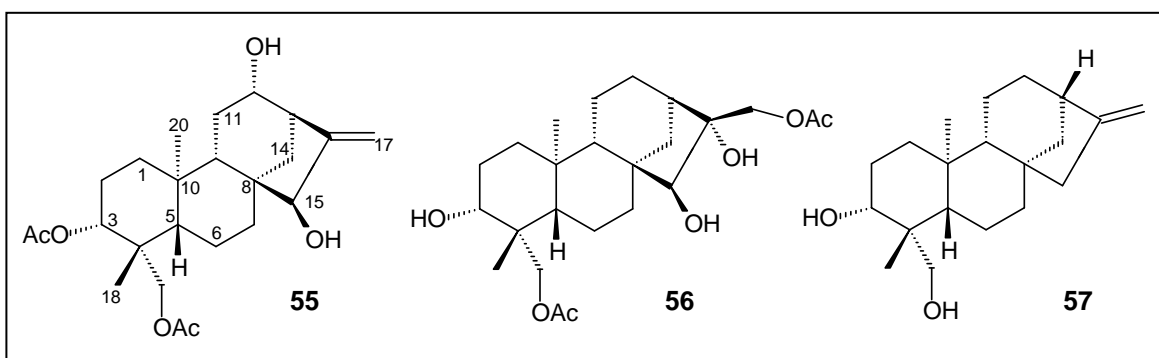


Figura 13 – Estruturas dos diterpenos **55-57** isolados de *M. polymorphum*.

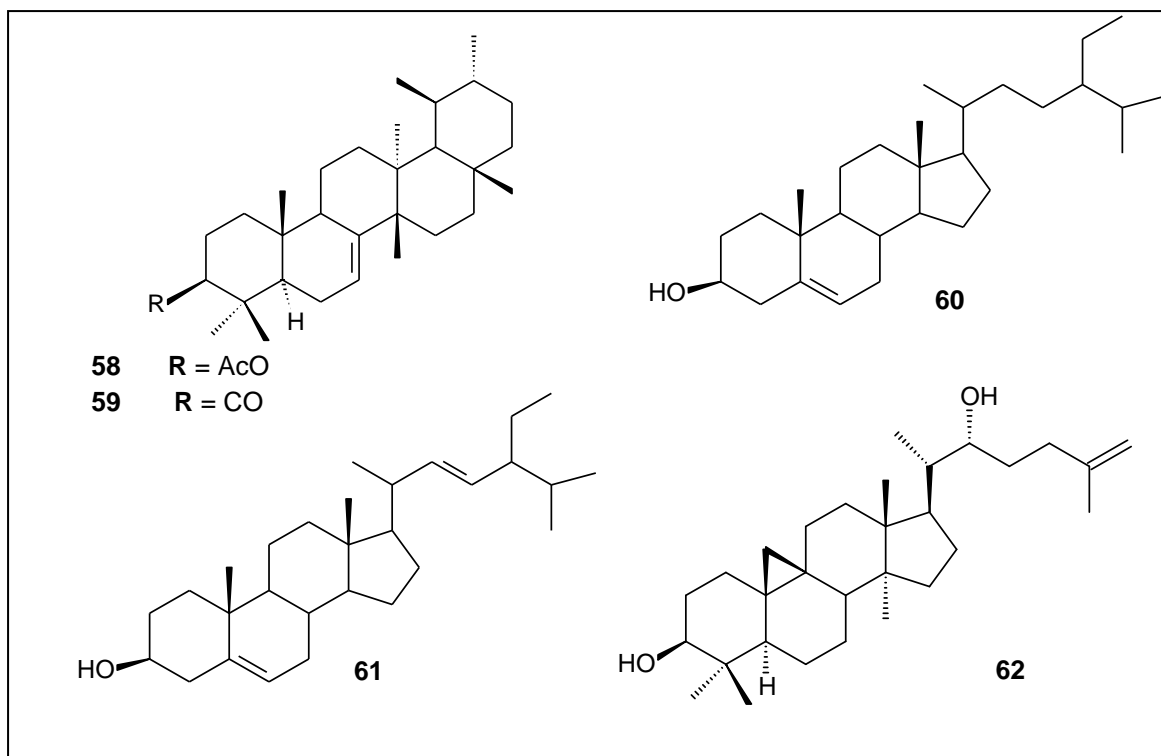


Figura 14 – Estruturas dos triterpenos **58-59** e **62**, e dos esteróides **60-61** isolados de *M. polymorphum*.

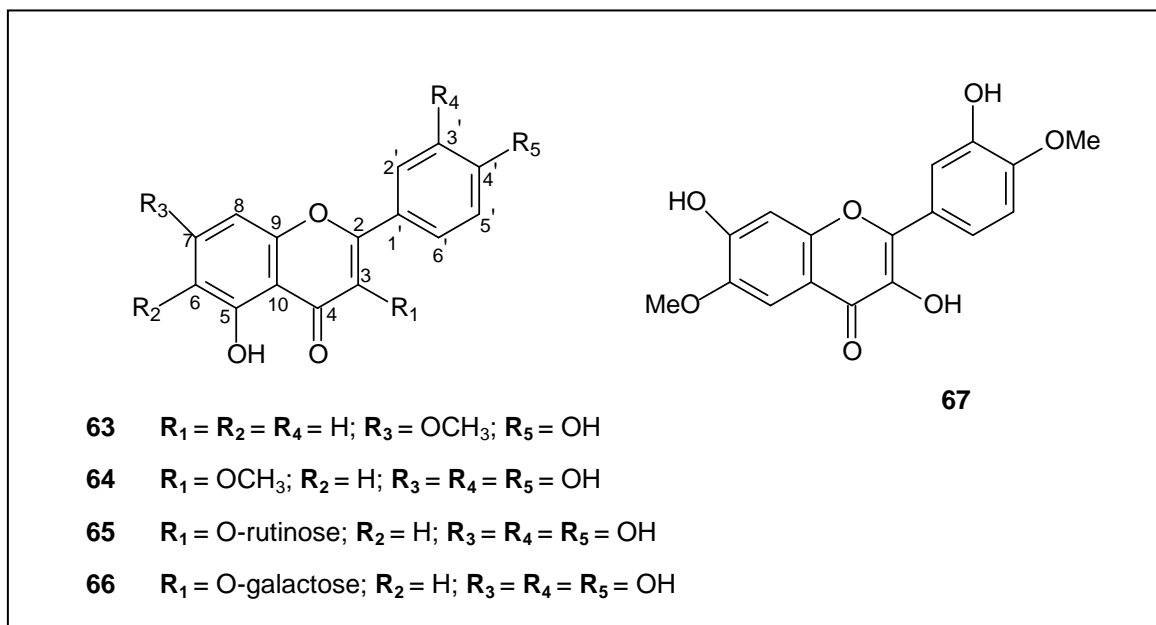


Figura 15 – Estruturas dos flavonóides **63-67** isolados de *M. polymorphum*.

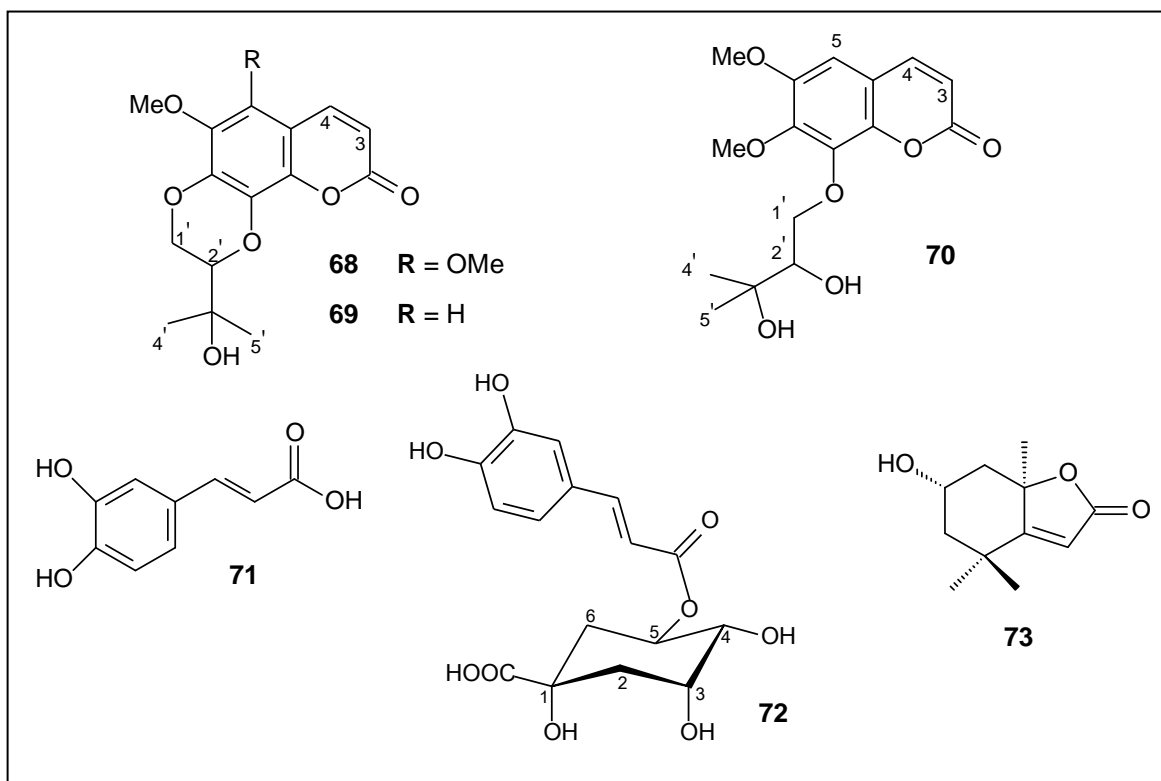


Figura 16 – Estruturas das cumarinas **68-70**, das substâncias fenólicas **71-72**, e do iridóide **73**, isolados de *M. polymorphum*.

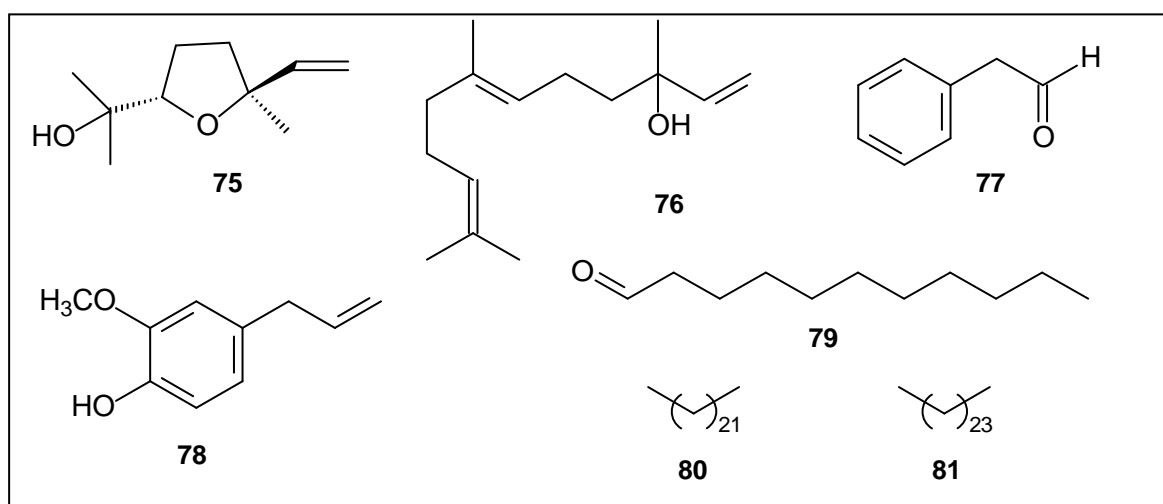


Figura 17 – Constituintes principais do óleo das flores de *M. polymorphum*.

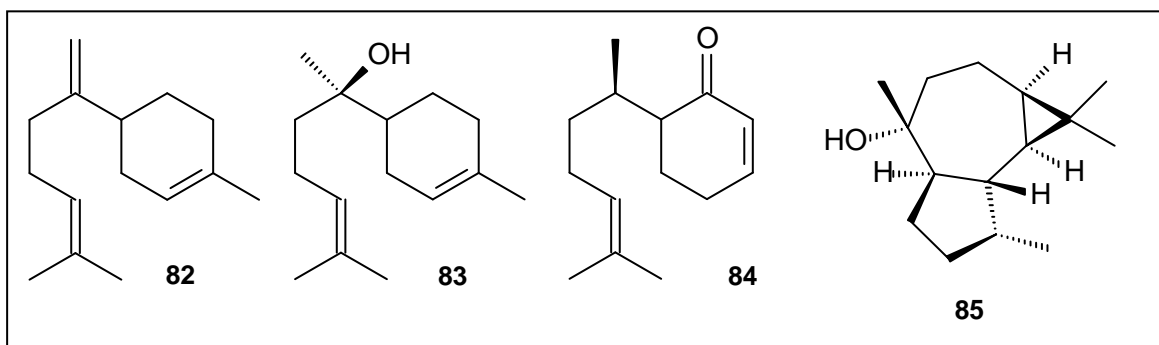


Figura 18 – Constituintes principais do óleo das raízes de *M. polymorphum*.

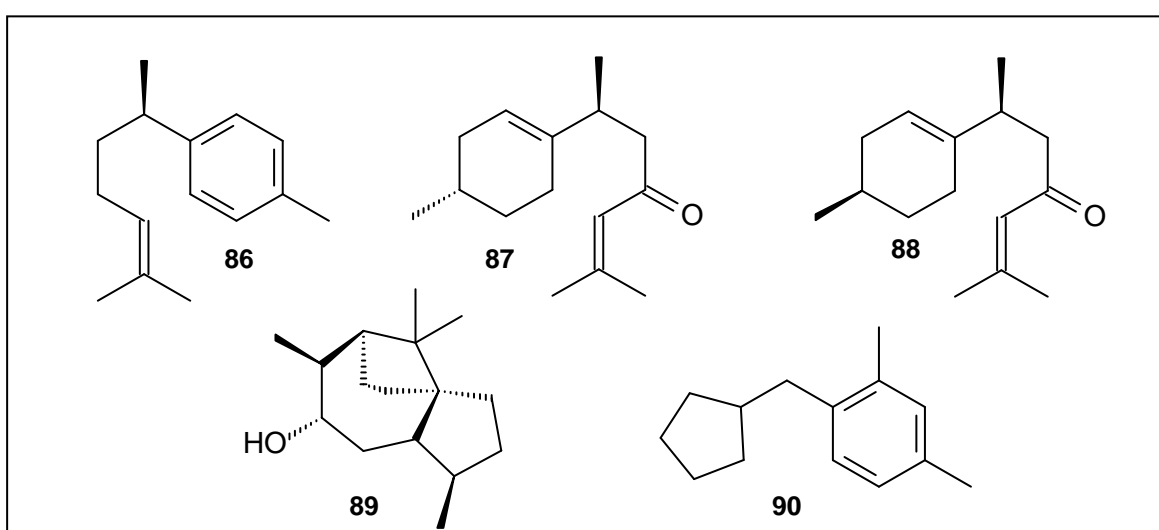


Figura 19 – Constituintes principais do óleo da madeira de *M. polymorphum*.

Tendo em vista, os resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo com *M. polymorphum* subsp. *polymorphum*, é relevante dar continuidade à pesquisa com esta planta, uma das mais usadas na medicina popular contra doenças respiratórias, com o intuito de aprofundar o conhecimento da sua composição química bem como das suas propriedades farmacológicas. Assim, o trabalho fitoquímico atual trata do estudo das frações mais polares do extrato etanólico das cascas do tronco, bem como de extratos de outras partes de *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum*.

2.3. Relação Estrutura-atividade de Lactonas Sesquiterpênicas com atividades citotóxica, anti-inflamatória e antioxidante

O câncer é uma neoplasia que atinge milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que para vários tipos não existe ainda um tratamento eficaz. Diversas teorias tentam explicar a origem do câncer, porém, a explicação mais aceita é a de que a doença seja "multifatorial", ou seja, pode ser desencadeada por uma série de fatores diferentes. Esses fatores podem ser tanto ambientais (exposição a agentes químicos ou biológicos), como individuais (predisposição genética, alterações hormonais, estados psicológicos, entre outros). Esta doença se caracteriza pela multiplicação descontrolada de células atípicas, sem controle do sistema imunológico humano. Estas células se dividem rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores. Nos próximos 20 anos, estima-se o surgimento de 22 milhões de novos casos da doença no mundo, e o número de mortes causadas pelo câncer deve atingir 13 milhões por ano (INCA, 2014).

Dentre as diversas formas de tratamento do câncer, a quimioterapia utiliza medicamentos para destruir as células doentes que formam um tumor. Os agentes químicos para o tratamento de câncer são chamados de antineoplásicos e possuem a finalidade de evitar ou inibir o crescimento e a disseminação de tumores. Isto é possível, devido ao fato de que, durante a etapa da divisão celular, as células cancerígenas crescem mais rápido de que as células normais. O grande problema é que diversos tipos de células normais, que também se desenvolvem de forma acelerada, são também afetadas pelos agentes antineoplásicos durante o tratamento quimioterápico (GHIRINGHELLI & APETOH, 2014). Esse fato contribui para a grande necessidade de descoberta de novas drogas antitumorais, que sejam mais seletivas.

Inflamação é um sintoma bastante comum em várias doenças, como por exemplo, asma, artrite reumatóide, esclerose múltipla e psoríase. As drogas usadas atualmente para o controle da inflamação geralmente apresentam efeitos adversos quando aplicadas por um longo período. Por esse motivo há interesse na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios (DEBNATH *et al.*, 2013).

O processo inflamatório é frequentemente associado com a presença de radicais livres. A oxidação se caracteriza pela transferência de elétrons, sendo considerado um processo fundamental no metabolismo dos seres vivos. No organismo, os radicais livres desempenham diversas funções, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de importantes substâncias biológicas. Seu excesso pode provocar uma série de danos nas estruturas das células, bem como nas suas funções, levando ao surgimento de várias doenças tais como câncer,

como consequência de alterações no DNA, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, entre outras (ALVES *et al.*, 2010). A medida da atividade antioxidante de extratos de plantas pode indicar espécies com potencial para o isolamento de substâncias com atividade anti-inflamatória e/ou anticâncer, além de auxiliar na determinação do mecanismo de ação dessas substâncias.

Várias classes de substâncias são promissoras para o tratamento do câncer e inflamação, incluindo lactonas sesquiterpênicas (ARAVINDARAN & YANG, 2010). As lactonas sesquiterpênicas constituem um grande e diversificado grupo de substâncias de grande ocorrência na natureza e representam a mais importante classe de metabólitos secundários da família Asteraceae (MERFORT, 2011; CHADWICK *et al.*, 2013).

Diversos estudos realizados para avaliar a relação entre estrutura-atividade demonstram que as propriedades físico-químicas bem como, as atividades biológicas dos compostos orgânicos dependem de suas estruturas moleculares. No caso das lactonas sesquiterpênicas, a presença de uma ligação dupla exocíclica conjugada ao anel da γ -lactona é essencial para que o composto apresente citotoxicidade (SCOTTI *et al.*, 2007; MERFORT, 2011; CHADWICK *et al.*, 2013). Isso ocorre porque o anel α -metileno- γ -lactona é capaz de reagir com grupos sulfidríla através de uma reação do tipo adição de Michael (Figura 20, p. 21).

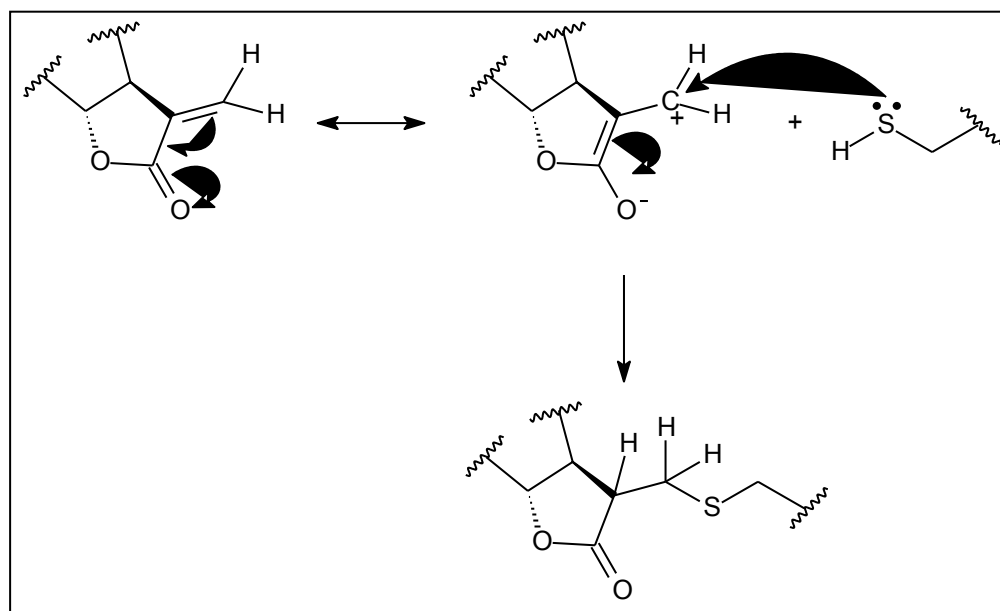


Figura 20 – Proposta de mecanismo da reação de adição de Michael de um grupo sulfidríla da cisteína com o grupo α -metileno- γ -lactona de lactonas sesquiterpênicas (Adaptado de MERFORT, 2011).

Com base nas diferenças do seu esqueleto carbocíclico, as lactonas sesquiterpênicas podem ser classificadas em quatro grupos principais: germacranolídeos, eudesmanolídeos, guaianolídeos e pseudoguaianolídeos (Figura 21, p. 22) (MERFORT, 2011). O sufixo “olídeo” refere-se ao grupo lactona.

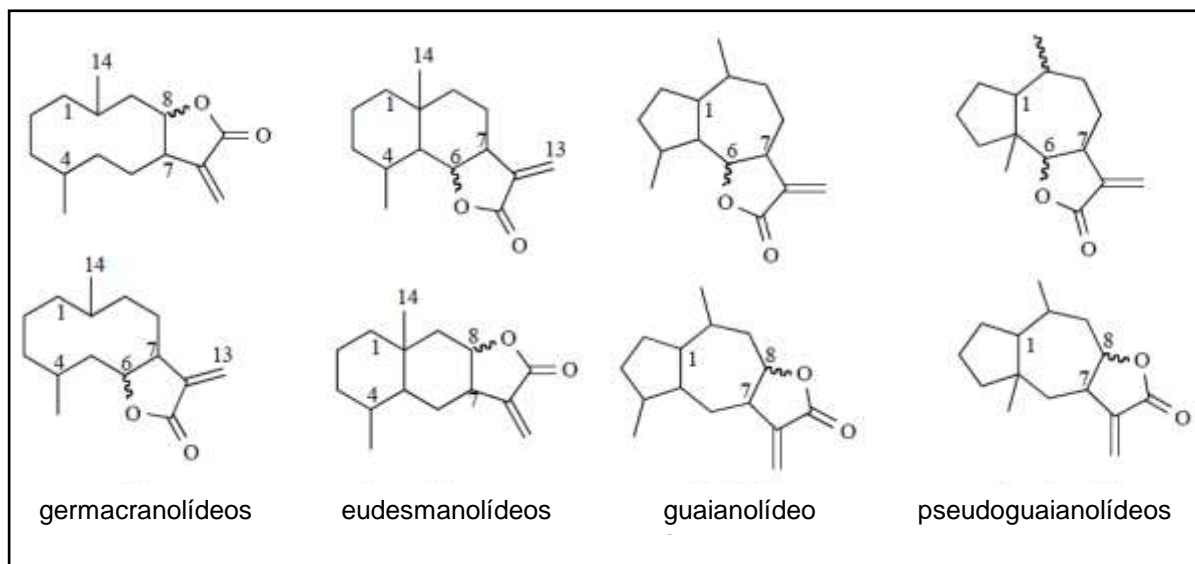


Figura 21 - Esqueletos básicos das lactonas sesquiterpênicas (MERFORT, 2011).

As características estruturais são determinantes para a atividade biológica das substâncias químicas. Pesquisas recentes demonstraram que as lactonas sesquiterpênicas mais ativas possuem esqueletos dos tipos guaianolídeo e pseudoguaianolídeo, pois apresentam uma estereoquímica mais adequada. É importante ressaltar que diferentes grupos funcionais também podem determinar um aumento na atividade biológica, como hidroxilas, grupos angelatos, anéis epóxidos, ésteres, glicosídeos, além de ligações duplas, tanto no anel lactônico como em outras posições, as quais permitem alquilações na estrutura. Além disso, as características eletrônicas dessas substâncias são fundamentais e estão relacionadas com a presença de oxigênio e ligações duplas, que aumentam a densidade eletrônica na molécula (SCOTTI *et al.*, 2007).

Entre as lactonas sesquiterpênicas ativas, algumas são consideradas altamente promissoras para o desenvolvimento de fármacos (Figura 22, p. 23), destacando-se helenalina (**91**) e partenolídeo (**92**), que despertam maior interesse, provavelmente por causa de sua forte atividade inibitória contra o fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B), um mediador envolvido no processo inflamatório; além de significativa disponibilidade comercial (MERFORT, 2011; MATHEMA *et al.*, 2012).

Como já mencionado, a espécie selecionada, *M. polymorphum* subsp. *floccosum* apresenta atividade antiinflamatória e, acumula várias lactonas sesquiterpênicas, incluindo lactonas diméricas, que são raras no reino vegetal. Portanto, existe uma grande possibilidade dessa espécie apresentar atividades antitumoral e antioxidante, embora não seja usada para esse fim na medicina popular.

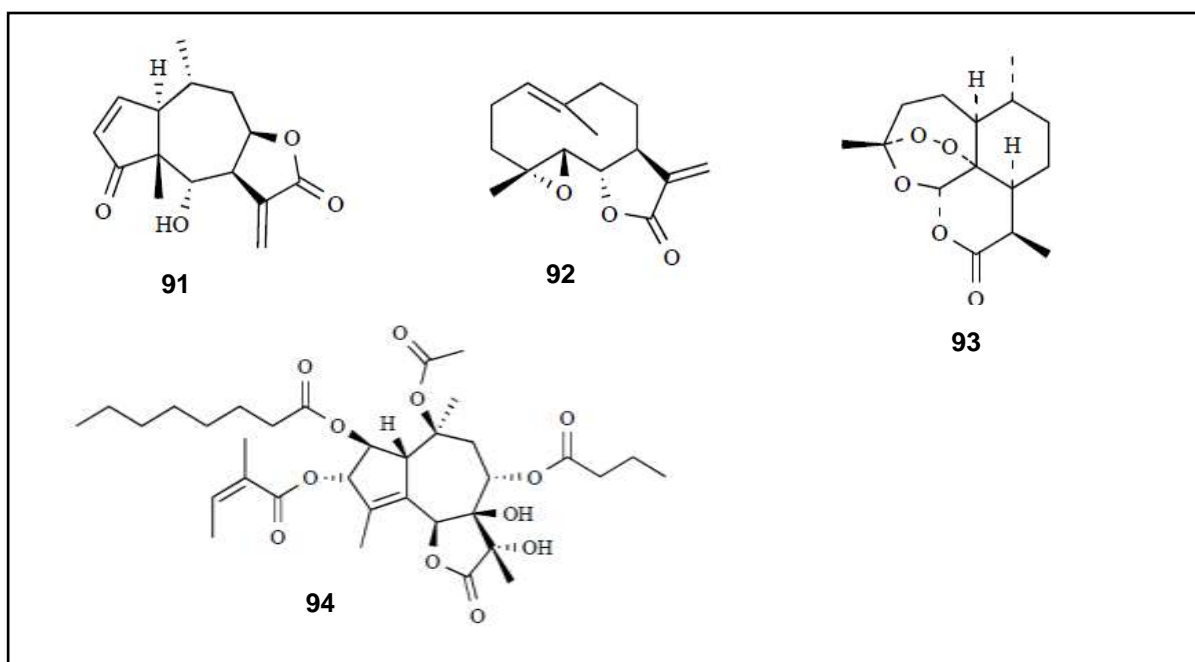


Figura 22 - Lactonas sesquiterpênicas consideradas mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos (MERFORT, 2011). **91**: Helenalina; **92**: Partenolideo; **93**: Artemisina; **94**: Tapsigargina.

3. OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVOS GERAIS

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades antioxidante e citotóxica de *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* (Cabrera) G. Sancho (Asteraceae).

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nas frações mais polares do extrato etanólico das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.
- Isolar e identificar os metabólitos secundários das flores de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.
- Determinar o perfil cromatográfico em CLAE das diferentes frações (“fingerprint”) e desenvolver metodologia para identificação das substâncias em misturas.
- Avaliar a composição química de diferentes partes da planta (cascas, folhas, flores) através da determinação do perfil cromatográfico em CLAE dos seus extratos e frações.
- Realizar ensaios de atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas com os extratos, frações e substâncias isoladas.
- Realizar ensaios de atividade antioxidante com os extratos e frações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1.1 - Procedimentos gerais

Para o desenvolvimento deste estudo, as substâncias foram isoladas através de técnicas cromatográficas clássicas ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nas separações cromatográficas em coluna aberta (CC) e sob vácuo (CLV), foi utilizado gel de sílica (Merck, 7734; 300 – 400 mesh). A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de 20 vezes a massa da amostra a ser purificada (MATTOS, 1997).

Para as análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram utilizadas placas cromatográficas comerciais com gel de sílica (Macherey-Nagel), com indicador de fluorescência F_{254} , as quais foram eluídas com migração ascendente do solvente em cuba saturada. Nas separações por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), foram utilizadas placas cromatográficas preparadas manualmente, espalhando-se uma suspensão de gel de sílica 60PF₂₅₄ (Merck) em água destilada sobre placas de vidro (20 x 20 cm), com espessura de 1,00 mm. A revelação das cromatoplas foi realizada com luz UV (254 e 366 nm) e também através da sua aspersão com solução etanólica de ácido sulfúrico 5% (v/v), seguida de aquecimento (HARBONE, 1998). As frações obtidas da CC foram agrupadas após análise comparativa por CCDA, através da comparação com os respectivos R_{fs} .

As substâncias isoladas foram identificadas através de técnicas espectrométricas: Ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC) e Espectrometria de Massas, bem como comparação com dados da literatura.

Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros modelos DPX-200, Avance-400 e/ou Avance III 600 (Bruker), operando a 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla (T), respectivamente, e observando a 200, 400 e 600 MHz para hidrogênio e; 50, 100 e 150 MHz para carbono, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em, aproximadamente, 0,5 mL de solvente deuterado (CDCl_3 e/ou CD_3OD), usando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) em relação ao TMS ($\delta = 0$ ppm). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

Análises por CG-EM foram realizadas em um Cromatógrafo à Gás/Espectrômetro de Massas Varian Saturn 2000 GC/MS, com ionização por impacto eletrônico de 70 eV. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar CP-Sil-8CB (30 m x 0,25 mm;

0,25 μm), operada nas seguintes condições: 60 °C por 3 min., em seguida programada até 220 °C a 5°C.min⁻¹ e, finalmente, mantida a 220 °C por 5 min. Foi utilizado como gás de arraste He (1 mL.min⁻¹). As amostras foram dissolvidas em éter etílico, sendo injetado 1 μL , com temperatura do injetor de 250 °C. O índice de retenção das substâncias (IR) foi calculado em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C19), analisada nas mesmas condições. As substâncias foram identificadas por comparação de seus espectros de massas e índices de retenção com a literatura (ADAMS, 2007). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB), Fundação Universidade Regional de Blumenau – FURB, pela Dra. Dilamara Riva Scharf. O espectro de massas de alta resolução foi obtido no Departamento de Bioquímica da UFPR, em um espectrômetro LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific), utilizando a técnica de ionização por spray de elétrons (ESI), no modo negativo. A amostra, dissolvida em MeOH: H₂O (7: 3, v/v), foi injetada na fonte sob um fluxo de 5 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um espectrômetro JASCO J-815 CD, no Departamento de Química da UFPR, dissolvendo-se a amostra em CHCl₃.

As medidas de rotação específica foram realizadas em polarímetro JASCO P-2000 POLARIMETER com lâmpada de sódio (589 nm) e clorofórmio como solvente, à temperatura de 20 °C. Os valores de rotação específica foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\text{rotação observada em graus} \times 100}{[\text{comprimento da cubeta (dm)} \times \text{concentração g/100 mL}]}$$

A estrutura cristalina de **M25** foi determinada por difratometria de raios X de monocristal. Os dados cristalográficos (intensidades das reflexões) foram obtidos através de um difratômetro automático de raios X para monocristais modelo Bruker D8 Ventura, equipado com detector de área Photon 100 e uma fonte de Cu-K α μS ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) com monocromador de espelhos Göbbel. Os quadros de imagens foram integrados utilizando o programa Bruker SAINT. A correção da absorção foi realizada utilizando o software SADABS e a estrutura foi resolvida e refinada utilizando o software Bruker SHELXTL. A coleta de dados foi realizada no Departamento de Química da UFPR, sob responsabilidade da Professora Dr^a. Jaísa Fernandes Soares. A resolução da estrutura foi realizada no Departamento de Química da UFSM, sob responsabilidade do Prof. Dr. Robert Alan Burrow. Os dados foram depositados no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), sob número 958004.

4.1.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas em um equipamento de Cromatografia HPLC Waters composto por bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower software. As análises foram conduzidas utilizando uma coluna analítica X-Terra C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, marca Waters. As separações das frações por CLAE foram conduzidas utilizando uma coluna semipreparativa X-Terra C18, 10 μm , 300 x 7,8 mm, marca Waters.

Para as fases móveis foram utilizados solventes orgânicos grau HPLC, filtrados em membranas de nylon (0,45 μm) da Millipore® e desgaseificadas por 30 min. em um banho de ultrassom, e água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q. As amostras solubilizadas foram filtradas em filtro Millex®HV PVDF (0,45 μm) da Millipore® (Cork, Ireland).

Foi utilizado o método do gradiente exploratório linear (SNYDER & DOLAN, 1996; SNYDER *et al.*, 1997), utilizando duas condições: (método 1) H₂O e ACN, variando de 5-100% ACN em 60 min. e mantida constante em 100% ACN até 60 min.; (método 2) H₂O-TFA 0,05 % e MeOH, variando de 5 - 100% MeOH em 60 min. e mantida constante em 100% MeOH até 60 min.

Para os perfis cromatográficos, utilizou-se fluxos de 0,8 ou 1 mL.min.⁻¹, volume de injeção de 10 μL e concentração das amostras de 1 mg.mL⁻¹. Para as separações na coluna semipreparativa, foram utilizados fluxos de 2,3 ou 2,8 mL.min.⁻¹ (fluxo calculado pelo software *Waters Prep Calculator*®), e os volumes variaram entre 50 μL e 150 μL , dependendo da complexidade de cada amostra. A detecção foi analisada nos comprimentos de onda de 211, 254, 280 e 325 nm. As amostras foram analisadas e purificadas através de diferentes métodos de acordo com a sua complexidade.

Nos métodos cromatográficos foram realizados gradientes de solventes no qual se aumentou a porcentagem de solvente orgânico em água, durante uma variação de tempo de 60, 30 ou 20 minutos (Métodos 1 - 7, p. 27 - 28).

Método 1: Método de gradiente linear exploratório 1

Tempo (min.)	Fluxo (mL.min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	ACN (% v/v)
0	1,0	95	5
60	1,0	0	100

Método 2: Método de gradiente linear exploratório 2

Tempo (min.)	Fluxo (mL.min. ⁻¹)	H ₂ O - TFA 0,05% (% v/v)	MeOH (% v/v)
0	0,8	95	5
60	0,8	0	100

Método 3: Método em CLAE Analítico utilizando gradiente de H₂O e ACN.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	ACN (% v/v)
0	1,0	70	30
60	1,0	0	100

Método 4: Método CLAE Semipreparativo utilizando gradiente de H₂O e ACN.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	ACN (% v/v)
0	2,8	70	30
20	2,8	0	100
30	2,8	0	100

Método 5: Método CLAE Semipreparativo utilizando gradiente de H₂O e MeOH.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	MeOH (% v/v)
0	2,3	70	30
10	2,3	50	50
20	2,3	50	50

Método 6: Método CLAE Semipreparativo utilizando gradiente de H₂O e MeOH.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	MeOH (% v/v)
0	2,3	50	50
20	2,3	14	86

Método 7: Método CLAE Semipreparativo utilizando gradiente de H₂O e MeOH.

Tempo (min.)	Fluxo (mL min. ⁻¹)	H ₂ O (% v/v)	MeOH (% v/v)
0	2,3	54	46
20	2,3	18	82

4.1.3 - Coleta e identificação do material botânico

A coleta do material botânico (flores, folhas e cascas do tronco), de exemplares de *Moquiniastrium polymorphum* (Less.) G. Sancho subsp. *floccosum* (Cabrera) G. Sancho, foi realizada em março de 2004 (flores) e em agosto de 2011 (folhas e cascas), em Curitiba (25° 28' 18" S 49° 13' 12" O), Paraná, Brasil. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Cervi (Departamento de Botânica, UFPR), que depositou uma exsicata no herbário da mesma instituição (UPCB) sob o número 30100.

4.1.4 - Preparação dos extratos e frações

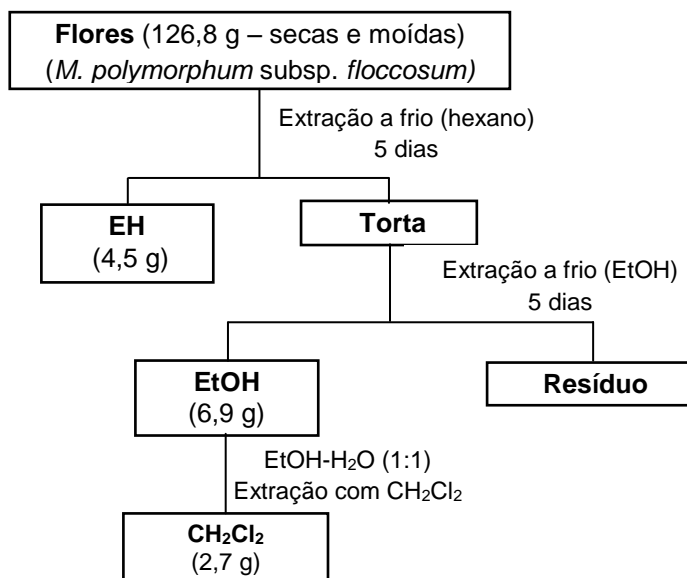
O material botânico de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (flores e cascas do tronco) foi secado em estufa a 40 °C e moído. A extração foi realizada a temperatura ambiente (maceração), com renovação de solvente a cada 24 h. O volume utilizado foi de 500 mL para cada 100 g de material. Após o período de maceração, o extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo a pressão reduzida.

As **flores (126,8 g)** foram extraídas com hexano e etanol, sucessivamente, fornecendo os respectivos extratos (EH 4,4 g; EtOH 6,9 g). O extrato EtOH foi particionado com diclorometano, fornecendo a respectiva fração CH₂Cl₂ (2,7 g) (Tabela 4, p. 29; Esquema 1, p. 30).

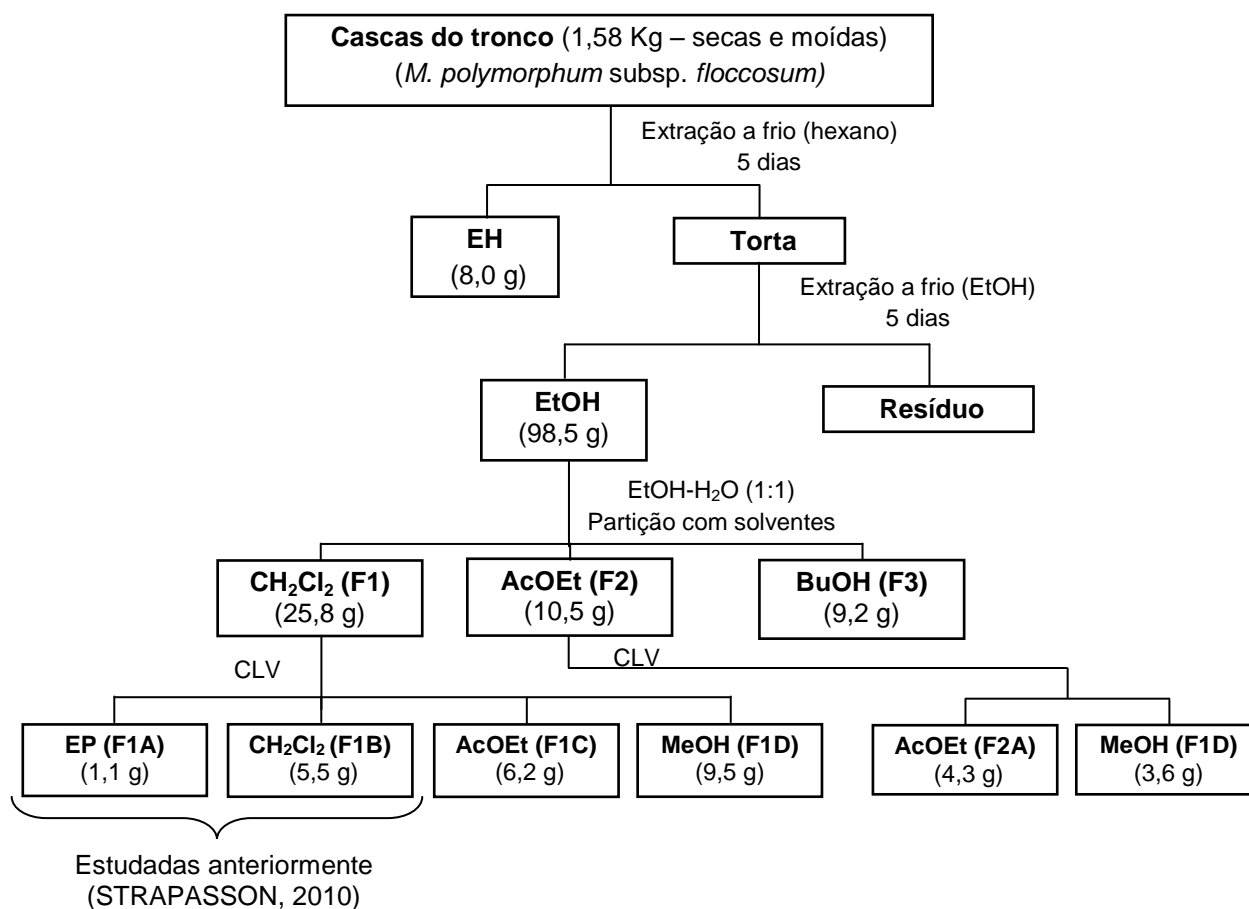
As **cascas do tronco (1,58 Kg)** foram extraídas com hexano e etanol, fornecendo os respectivos extratos (EH - 8,0 g; EtOH - 98,5g). O extrato EtOH foi dissolvido em EtOH: H₂O (1:1) e submetido à partição sequencial com diclorometano, acetato de etila e 1-butanol, rendendo as respectivas frações após a evaporação dos solventes (F1- CH₂Cl₂, 25,8 g; F2- AcOEt, 10,5 g e F3- BuOH, 9,2 g). Os resíduos remanescentes foram desprezados (Esquema 2, p. 30). Após secagem total dos extratos e frações, os rendimentos foram calculados (Tabela 4, p. 29). Para o isolamento dos constituintes das cascas do tronco, a fração F1 (25,8 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV) rendendo as frações em éter de petróleo - EP (F1A, 1,1 g), CH₂Cl₂ (F1B, 5,5 g), AcOEt (F1C, 6,2 g) e MeOH (F1D, 9,5 g). As frações F1A e F1B foram estudadas anteriormente (STRAPASSON, 2010), sendo analisadas neste trabalho as frações F1C e F1D. A fração em AcOEt resultante da partição inicial (F2, 10,5 g) foi submetida à CLV, eluída com AcOEt e MeOH, rendendo as respectivas frações F2A e F2B. Também foi analisada, através de CLAE a fração F3 (BuOH), resultante da partição inicial.

Tabela 4 – Rendimento de extratos e frações brutas de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

Parte da planta	Massa (g)	Rendimento em g (%)				
		Ext. hexânico (EH)	Ext. etanólico (EtOH)	CH ₂ Cl ₂ (F1)	AcOEt (F2)	BuOH (F3)
Flores	126,8	4,5 (3,5)	6,9 (5,4)	2,7 (39,1)	-	-
Cascas do tronco	1580,0	8,0 (0,5)	98,5 (6,2)	25,8 (26,2)	10,5 (10,6)	9,2 (9,3)



Esquema 1 – Fluxograma de obtenção dos extratos e frações brutas das flores de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.



Esquema 2 – Fluxograma de obtenção dos extratos e frações brutas das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

4.1.5 – Isolamento dos constituintes das flores de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

A fração em CH_2Cl_2 (2,7 g) foi submetida ao fracionamento através de uma CC (altura (h) x diâmetro (Φ) = 48,0 x 2,0 cm), eluída com quantidades crescentes de AcOEt em hexano, seguida por eluição com AcOEt puro e por último com MeOH puro. Foram recolhidas 116 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram reunidas em 11 grupos de frações (**I-XI**), após comparação por CCDA de acordo com os seus respectivos R_{fs} (Tabela 5, p. 31; Esquema 5, p. 35).

Tabela 5 – Fracionamento da fração CH_2Cl_2 das flores.

Grupos	Frações	Códigos	Solvente (v/v)	Massa (mg)	Substâncias identificadas	Quantidade (mg)
I	1 - 16	GPFD1	Hex: AcOEt 95:5	9,5	-	-
II	17 - 25	GPFD17	Hex: AcOEt 90:10	291,0	M1+M2+M3 M4+ M5+M6	13,6 14,9
III	26 - 33	GPFD26	Hex: AcOEt 90:10	17,4	-	-
IV	34 - 37	GPFD34	Hex: AcOEt 90:10	11,8	-	-
V	38 - 40	GPFD38	Hex: AcOEt 90:10	7,1	-	-
VI	41 - 50	GPFD41	Hex: AcOEt 80:20	54,8	M7+M8+M9+M10+ M11	7,2
VII	51 - 57	GPFD51	Hex: AcOEt 80:20	49,1	M12+M13	7,0
VIII	58 - 72	GPFD58	Hex: AcOEt 80:20	35,0	M14+M15	12,2
XIX	73 - 98	GPFD73	Hex: AcOEt 75:25	62,3	-	-
X	99 - 115	GPFD99	Hex: AcOEt 50:50; 0:100	65,8	-	-
XI	116	GPFD116	MeOH	1040,0	-	-

O grupo **II** (291,0 mg) foi submetido ao fracionamento, através de uma CC (h x Φ = 36,0 x 1,0 cm), eluída com hexano:AcOEt, nas proporções 100:0, 95:5 e 90:10. Foram recolhidas 18 frações, agrupadas em três após análise por CCDA (II-1, II-2 e II-3). O subgrupo **II-3** (102,8 mg) foi purificado por CCDP eluída em pentano:AcOEt (95:5), rendendo 7 subfrações. A subfração **II-3A** (13,6 mg) forneceu uma mistura de **M1**, **M2** e **M3**. A subfração **II-3B** (14,9 mg) forneceu uma mistura de **M4**, **M5** e **M6**, a qual foi submetida a uma reação de transesterificação (Esquema 3, p. 33), rendendo duas frações, uma com a mistura de ésteres graxos metílicos (5,4 mg) a qual foi analisada

através de CG-EM, e a outra com os álcoois triterpênicos derivados de **M4**, **M5** e **M6** (1,5 mg).

O grupo **VI** (54,8 mg) foi submetido à CCDP eluída em hexano:AcOEt (8:2), sendo obtidas 4 subfrações. A subfração **VI-B** (10,7 mg) foi purificada através de uma nova CCDP eluída em hexano:CH₂Cl₂:AcOEt (2:1:0,5) rendendo uma mistura de **M7**, **M8**, **M9**, **M10** e **M11** (7,2 mg).

O grupo **VII** (49,1 mg) foi submetido à CCDP eluída, duas vezes, em hexano:CH₂Cl₂ (1:1), sendo obtidas 5 subfrações. A subfração **VII-B** (7,0 mg), contendo **M12** e **M13** foi submetida à reação de esterificação com MeOH, em meio ácido, rendendo uma mistura dos seus respectivos ésteres metílicos (2,4 mg) que foi analisada através de CG-EM.

O grupo **VIII** (35,0 mg) foi submetido à CCDP eluída em hexano:AcOEt 8:2, sendo obtidas 4 subfrações. A subfração **VIII-B** rendeu **M14** e **M15** (12,2 mg).

As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura ou a identificação de outras substâncias em mistura (Esquema 5, p. 35).

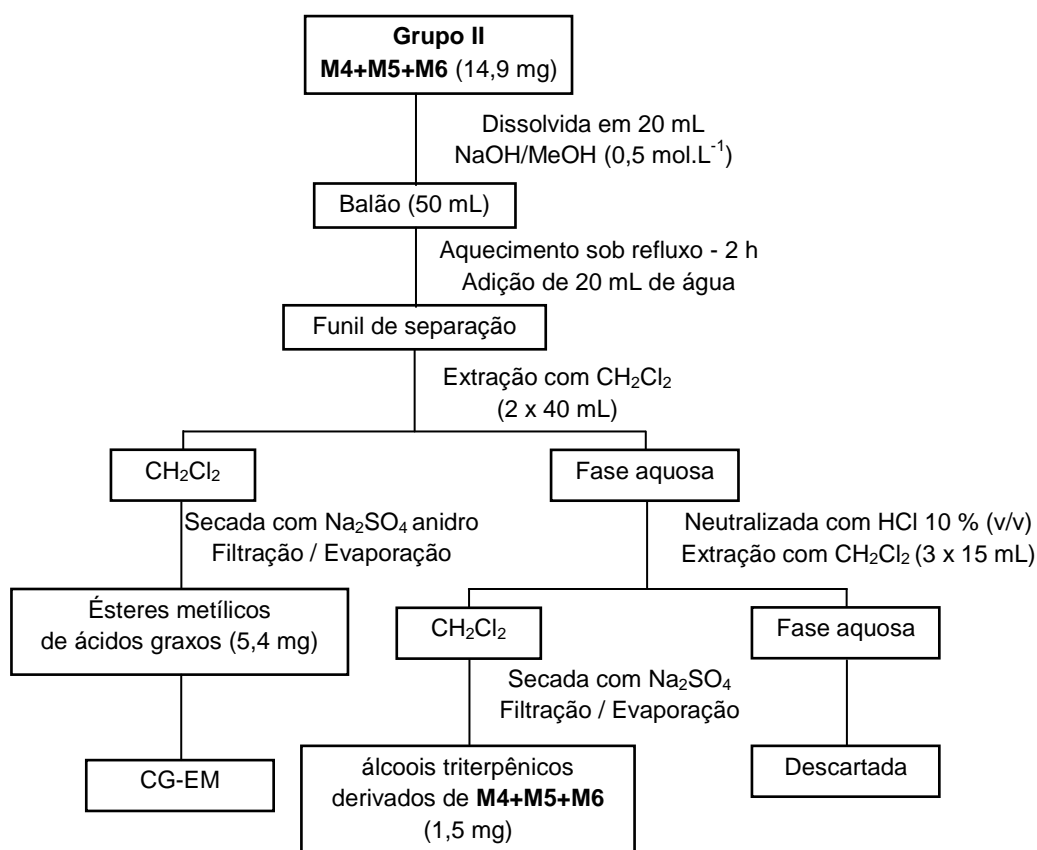
4.1.6 – Reação de transesterificação de ésteres triterpênicos

A subfração **II-3B** (14,9 mg), contendo a mistura das substâncias **M4**, **M5** e **M6**, foi dissolvida em 20 mL de NaOH/MeOH (0,5 mol L⁻¹), transferida para um balão de 50 mL e aquecido sob refluxo por 2 h. Em seguida, foram adicionados 20 mL de água ao sistema reacional e esta solução foi transferida para um funil de separação para ser extraído com 40 mL de CH₂Cl₂, por duas vezes sucessivas. A fase diclorometânica foi secada com Na₂SO₄, e o solvente evaporado à pressão reduzida, rendendo uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos. A fase aquosa (superior) foi neutralizada com HCl 10 % (v/v) e em seguida, foi submetida a três extrações sucessivas, utilizando-se 15 mL de CH₂Cl₂ em cada extração. A nova fase diclorometânica foi secada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada, rendendo uma mistura de álcoois triterpênicos (1,5 mg). A última fase aquosa foi descartada (Esquema 3, p.33) (MENDES *et al.*, 1999).

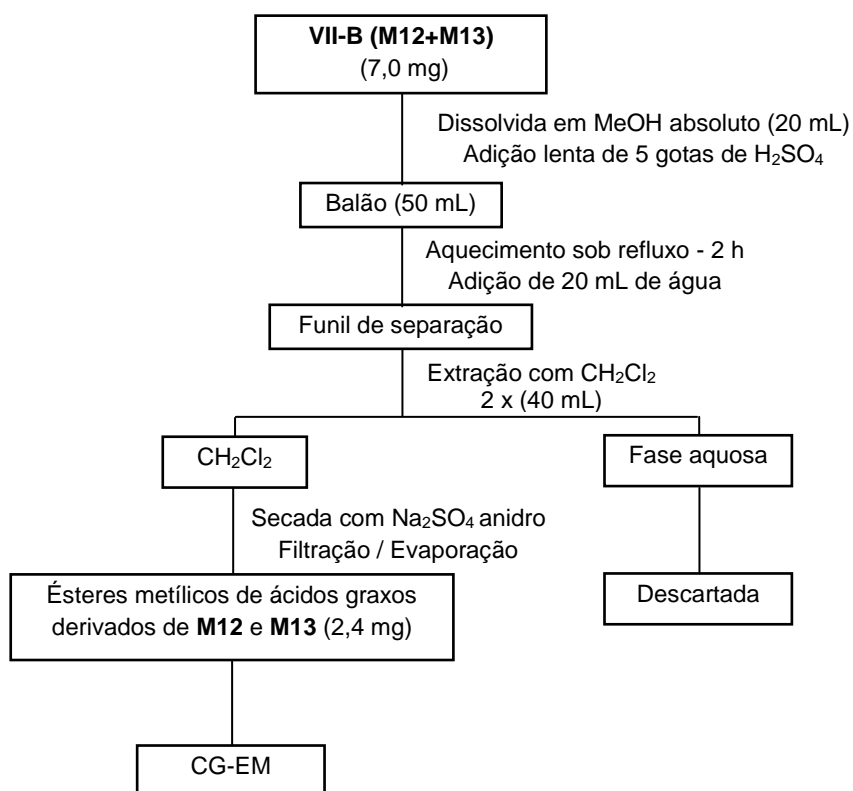
4.1.7 – Reação de esterificação de ácidos graxos

A amostra **VII-B** (7,0 mg), contendo a mistura das substâncias **M12** e **M13**, foi dissolvida em 20 mL de metanol absoluto, sendo adicionadas, lentamente, 5 gotas de H₂SO₄. Esta solução, completamente homogeneizada com o auxílio de ultrassom, foi transferida para um balão de 50 mL, sendo colocada em refluxo por 2 h. Em seguida,

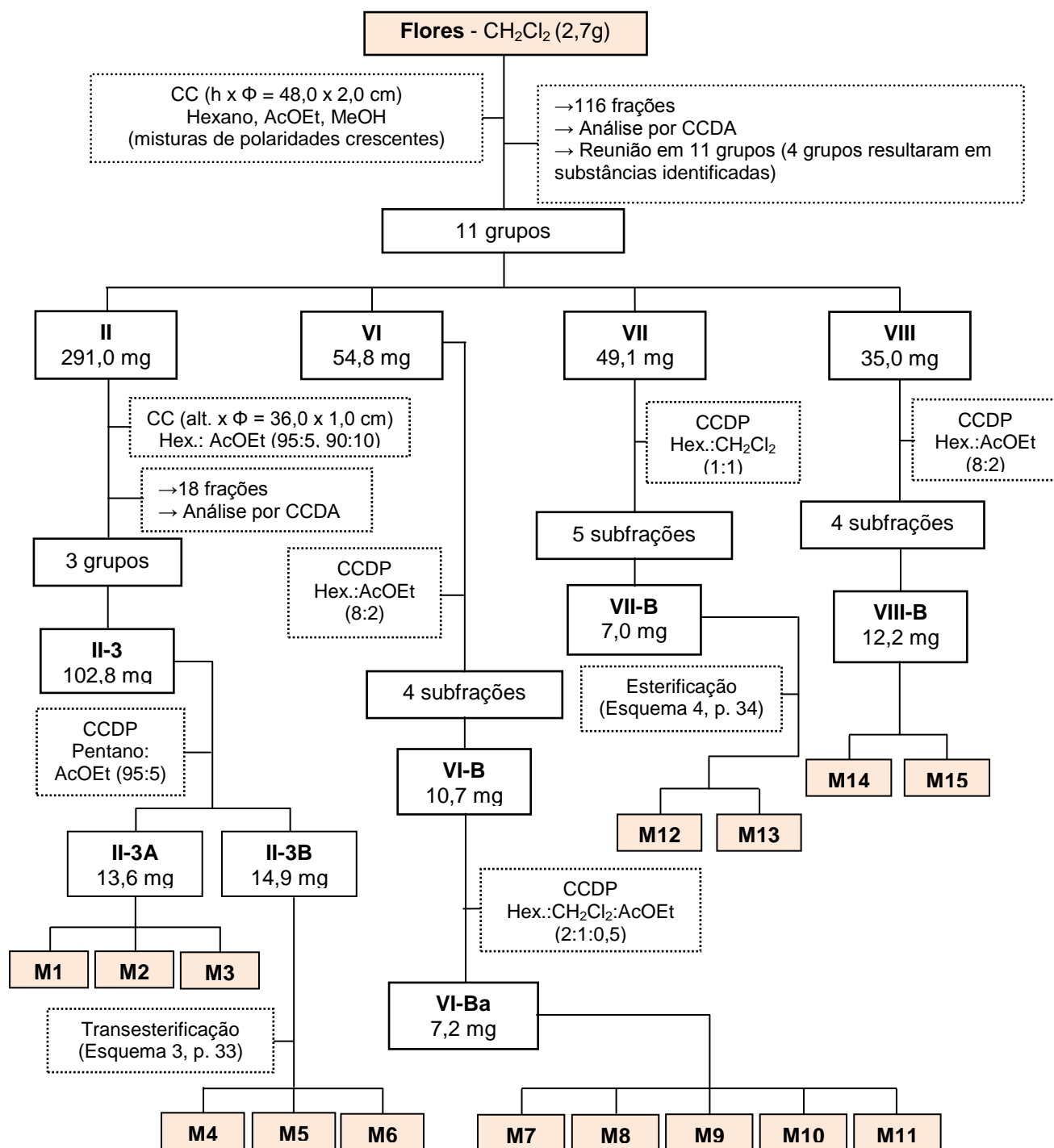
foram adicionados 20 mL de água ao sistema reacional e a mistura foi transferida para um funil de separação para ser extraído com 40 mL de CH_2Cl_2 , por duas vezes sucessivas. A fase diclorometânica foi secada com Na_2SO_4 anidro, e o solvente evaporado em evaporador rotativo à pressão reduzida, rendendo uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (2,4 mg) que foi analisada através de CG-EM. A fase aquosa foi descartada (Esquema 4, p. 34).



Esquema 3 – Reação de transesterificação de ésteres triterpênicos (MENDES *et al.*, 1999).



Esquema 4 – Reação de esterificação de ácidos graxos.



Esquema 5 – Fracionamento da fração em CH₂Cl₂ das flores de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

4.1.8 – Isolamento dos constituintes da fração F1C das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

A fração **F1C** (6,2 g) foi inicialmente fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica CC ($h \times \Phi = 52,0 \times 4,0$ cm), eluída primeiramente com CH_2Cl_2 puro, posteriormente com CH_2Cl_2 : acetona 90:10, aumentando gradativamente a polaridade até CH_2Cl_2 :acetona 50:50, por fim acetona pura seguida de MeOH. O eluato foi recolhido em 51 frações, de aproximadamente 50 mL, as quais foram reunidas em 16 grupos (I-XVI), após comparação por CCDA de acordo com os seus R_{fs} (Tabela 6, p. 36; Esquema 6, p. 38).

Tabela 6 – Fracionamento da fração **F1C** das cascas do tronco.

Grupos	Frações	Códigos	Solvente (v/v)	Massa (mg)	Substâncias identificadas	Quantidade (mg)
I	1	GPCA1	CH_2Cl_2	6,4	-	-
II	2	GPCA2	CH_2Cl_2	12,6	-	-
III	3 – 5	GPCA3	CH_2Cl_2 :acetona 90:10	25,7	-	-
IV	6 – 8	GPCA6	CH_2Cl_2 :acetona 90:10	22,9	-	-
V	9	GPCA9	CH_2Cl_2 :acetona 90:10	99,7	-	-
VI	10 – 11	GPCA10	CH_2Cl_2 :acetona 80:20	133,5	M14+M15	2,0
					M16	5,3
VII	12 – 14	GPCA12	CH_2Cl_2 :acetona 80:20	301,5	M17	6,2
					M18+M19	2,0
					M17	7,5
					M20	10,0
VIII	15 – 20	GPCA15	CH_2Cl_2 :acetona 70:30	1071,6	M21	6,6
					M22	10,0
					M23	6,5
					M24	5,2
IX	21 – 25	GPCA21	CH_2Cl_2 :acetona 60:40	748,9	M25	4,0
					M26	3,2
					M27	10,0
					M28	2,3
X	26 – 34	GPCA26	CH_2Cl_2 :acetona 50:50	1361,4	M29	3,6
					M30+M31	7,0
					M32+M33	12,6
XI	35 – 39	GPCA35	CH_2Cl_2 :acetona 50:50	309,4	-	-
XII	40 – 44	GPCA40	acetona	719,4	-	-
XIII	45 – 47	GPCA45	acetona	188,2	-	-
XIV	48	GPCA48	MeOH	167,2	-	-
XV	49 – 50	GPCA49	MeOH	431,3	-	-
XVI	51	GPCA51	MeOH	187,3	-	-

Uma parte (31,2 mg) do grupo **VI** (133,5 mg) foi submetida à CCDP em gel de sílica, eluída duas vezes por hexano:acetona (7:3), sendo obtidas 9 subfrações. A subfração **VI-B** rendeu a substância **M16** (5,3 mg). A subfração **VI-H** rendeu a mistura (2,0 mg) de **M14** e **M15**.

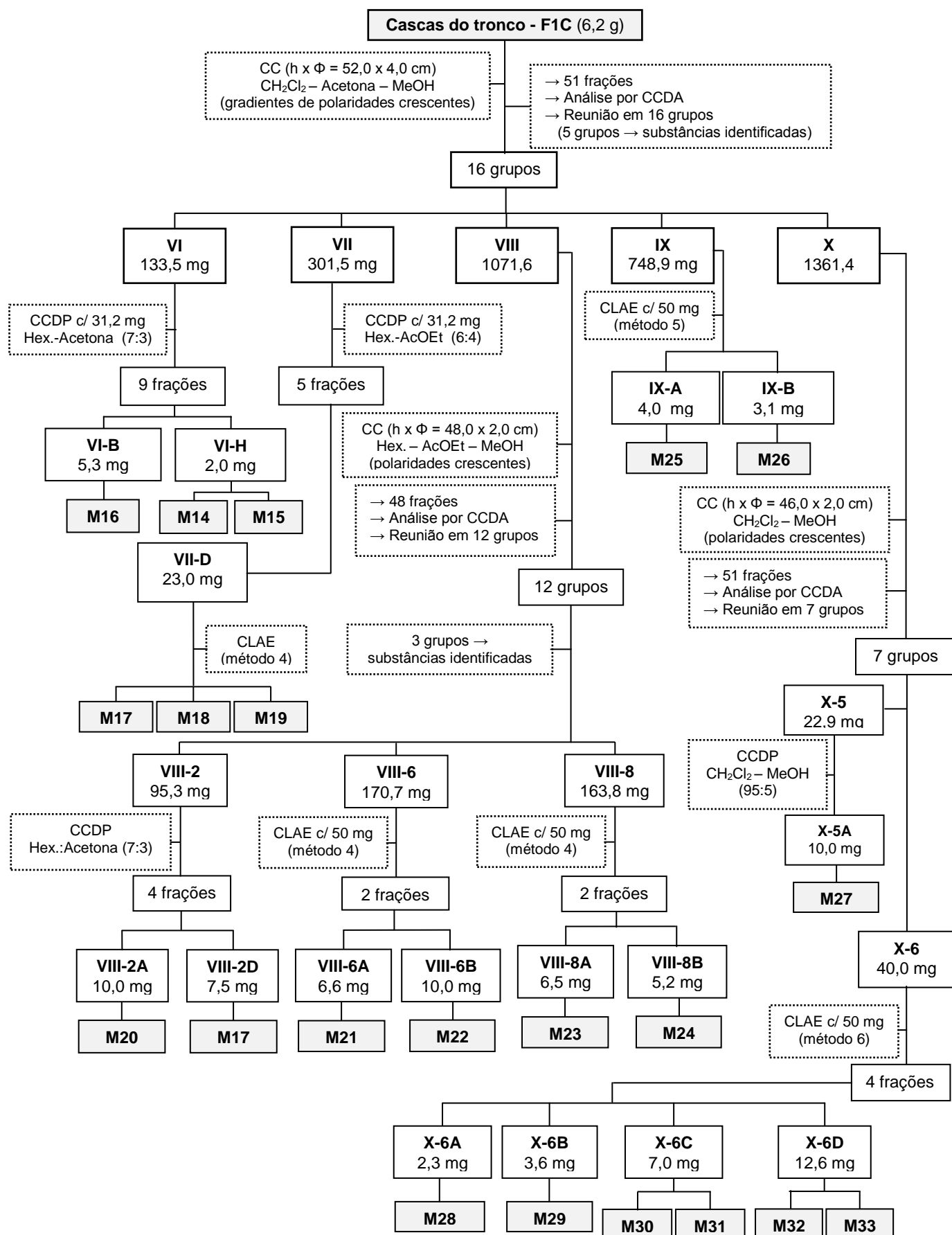
Uma parte (80,0 mg) do grupo **VII** (301,5 mg) foi submetida à CCDP em alumina, eluída duas vezes por hexano:AcOEt (4:6), sendo obtidas 5 subfrações. A subfração **VII-D** (23,0 mg) foi submetida à separação por CLAE, através do método 4 (p. 28), resultando no isolamento da substância **17** (6,2 mg) e uma mistura das substâncias **M18** e **M19** (2,0 mg).

O grupo **VIII** (1071,6 mg) foi submetido à CC em gel de sílica ($h \times \Phi = 48,0 \times 2,0$ cm), eluída com quantidades crescentes de AcOEt em hexano, em seguida AcOEt puro, e posteriormente gradientes de polaridades crescentes de AcOEt e MeOH. O eluato foi recolhido em 45 frações de aproximadamente 50 mL, reunidas em 12 grupos (1-12). O grupo **VIII-2** (95,3 mg) foi submetida à CCDP eluída três vezes com hexano:acetona 7:3, sendo obtidas 4 subfrações. A subfração **VIII-2A** resultou na substância **M20** (10,0 mg). A subfração **VIII-2D** resultou na substância **M17** (7,5 mg). Uma parte (50 mg) do grupo **VIII-6** (170,7 mg) foi separada por CLAE, utilizando gradiente de H₂O:ACN (método 4, p. 28), rendendo as substâncias **M21** (6,6 mg) e **M22** (10,0 mg). Da mesma forma, uma parte (50 mg) do grupo **VIII-8** (163,8 mg) foi separada por CLAE, através do mesmo método 4 (p. 28), rendendo as substâncias **M23** (6,5 mg) e **M24** (5,2 mg).

Uma alíquota (40 mg) do grupo **IX** (748,9 mg) foi submetida à separação por CLAE, utilizando gradiente de H₂O:MeOH (método 5, p. 28), rendendo as substâncias **M25** (4,0 mg) e **M26** (3,1 mg).

O grupo **X** (1361,4 mg) foi submetido à CC em gel de sílica ($h \times \Phi = 46,0 \times 2,0$ cm), eluída com quantidades crescentes de MeOH em CH₂Cl₂, em seguida MeOH puro, e por último acetona pura. O eluato foi recolhido em 51 frações de aproximadamente 10 mL, as quais foram reunidas em 7 grupos (1-7), após comparação por CCDA de acordo com os seus respectivos R_fs. O grupo **X-5** (22,9 mg), foi submetida à CCDP em gel de sílica, eluída por CH₂Cl₂:MeOH 95:5, fornecendo **M27** (10,0 mg). Uma parte (40,0 mg) do grupo **X-6** (166,8 mg) foi separada por CLAE, através do método 6 (p. 28), rendendo as substâncias **M28** (2,3 mg), **M29** (3,6 mg), além de duas misturas contendo as substâncias **M30** e **M31** (7,0 mg) e **M32** e **M33** (12,6 mg).

As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura ou a identificação de outras substâncias em mistura (Esquema 6, p. 38).



Esquema 6 – Fracionamento da fração F1C das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

4.1.9 – Isolamento dos constituintes da fração F2A das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

A fração **F2A** (4,3 g) foi inicialmente fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica (CC - altura x Φ = 52,0 x 4,0 cm), eluída primeiramente com CH₂Cl₂:AcOEt nas proporções 20:30 e 10:40, seguida de AcOEt puro e, posteriormente, gradiente de AcOEt: MeOH nas proporções 98:2, 95:5, 80:20, 70:30, 50:50, e, por último, metanol puro. O eluato foi recolhido em 43 frações de aproximadamente 50 mL, as quais foram reunidas em 17 grupos, após comparação por CCDA de acordo com os seus respectivos R_{fs} (Tabela 7, p. 39; Esquema 7, p. 40).

Tabela 7 – Fracionamento da fração **F2A** das cascas do tronco.

Grupos	Frações	Códigos	Solvente (v/v)	Massa (mg)	Substâncias identificadas	Quantidade (mg)
I	1 - 2	GPAA1	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 40:60	21,0	-	-
II	3 - 4	GPAA3	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 40:60	53,6	M17	53,6
III	5 - 6	GPAA5	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 40:60	25,6	-	-
IV	7 - 8	GPAA7	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20:80	45,1	-	-
V	9	GPAA9	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20:80	68,0	-	-
VI	10 - 11	GPAA10	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20:80	254,2	-	-
					M30+M31	11,3
					M32+M33	6,3
VII	12	GPAA12	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20:80	293,8	M34	25,2
					M35	10,7
VIII	13	GPAA13	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 10:90	236,0	-	-
XIX	14 - 23	GPAA14	AcOEt	795,0	-	-
X	24	GPAA24	AcOEt:MeOH 98:2	102,0	M34	1,0
					M36	2,0
XI	25 - 26	GPAA25	AcOEt:MeOH 95:5	170,0	-	-
XII	27 - 29	GPAA27	AcOEt:MeOH 90:10	220,5	-	-
XIII	30 - 33	GPAA30	AcOEt:MeOH 80:20	331,8	-	-
XIV	34	GPAA34	AcOEt:MeOH 70:30	128,5	M36	1,6
					M37	2,5
XV	35	GPAA35	AcOEt:MeOH 70:30	74,9	-	-
XVI	36 - 39	GPAA36	AcOEt:MeOH 50:50	367,9	-	-
XVII	40 - 43	GPAA40	MeOH	87,8	-	-

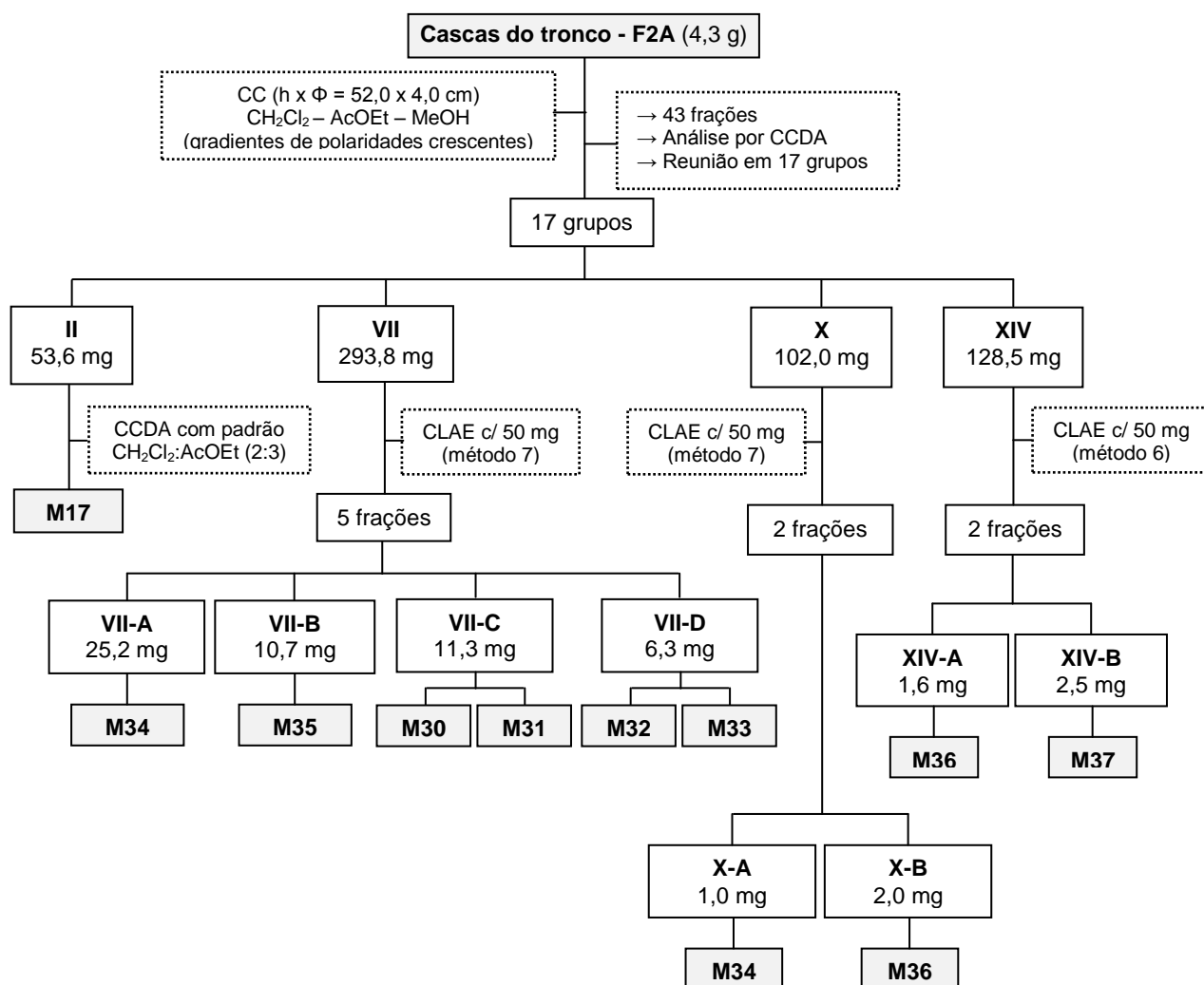
O grupo **II** (53,6 mg) continha **M17**.

Uma parte (50,0 mg) do grupo **VII** (293,8 mg) foi submetida à CLAE (Método 7, p. 28), sendo obtidas 5 subfrações. A subfração **VII-A** (25,2 mg) continha **M34**. A subfração **VII-B** forneceu **M35** (10,7 mg). A subfração **VII-C** continha **M30+M31** (11,3 mg). A subfração **VII-D** forneceu **M32+M33** (6,3 mg).

Uma parte (50,0 mg) do grupo **X** (102,0 mg) foi submetida à CLAE (Método 7, p. 28), sendo obtidas 2 subfrações. A subfração **X-A** forneceu **M34** (1,0 mg). A subfração **X-B** forneceu **M36** (2,0 mg).

Uma parte (50,0 mg) do grupo **XIV** (128,5 mg) foi submetida à CLAE (Método 6, p. 28), sendo obtidas 2 subfrações. A subfração **XIV-A** forneceu **M36** (1,6 mg). A subfração **XIV-B** forneceu **M37** (2,5 mg).

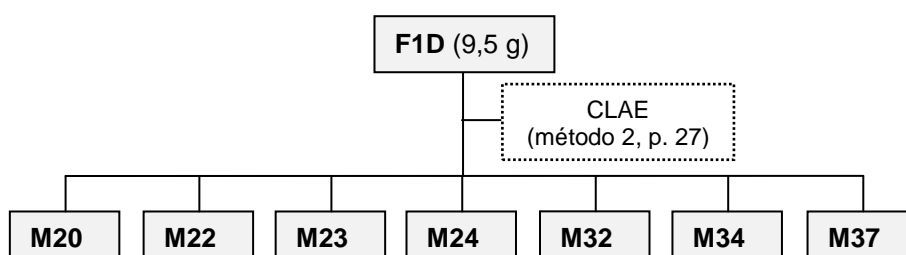
As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura ou a identificação de outras substâncias em mistura (Esquema 7, p. 40).



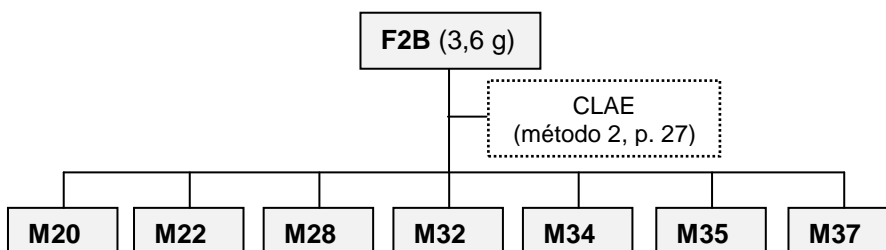
Esquema 7 – Fracionamento da fração **F2A** das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

4.1.10 – Estudo das frações F1D, F2B e F3 das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

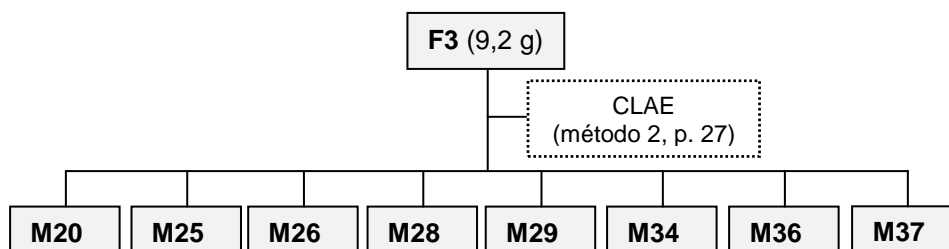
Os constituintes isolados das frações **F1C** e **F2A** foram utilizados como padrões para identificação das substâncias presentes nas frações **F1D**, **F2B** e **F3**. A Identificação das substâncias foi realizada através da CLAE (Método 2, p. 27), comparando-se os tempos de retenção e espectros no UV dos padrões com os picos dos cromatogramas das frações analisadas (Esquemas 8 – 10, p. 41).



Esquema 8 – Substâncias identificadas na fração **F1D**.



Esquema 9 – Substâncias identificadas na fração **F2B**



Esquema 10 – Substâncias identificadas na fração **F3**.

4.2 – ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados *in vitro*, utilizando as seguintes linhagens de células tumorais humanas: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia). Também foi testada a linhagem de célula não tumoral VERO (rim, macaco verde).

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito anteriormente (SKEHAN *et al.*, 1990). As linhagens de células tipo ATCC (*American Type Culture Collection*) foram distribuídas em pratos de 96 poços (100 μ L célula/poço) e tratadas com quatro níveis diferentes de concentração 0,25; 2,5; 25,0 e 250,0 μ g mL⁻¹ da amostra em DMSO 0,1 % (v/v) a 37 °C, com 5 % (v/v) de CO₂ por 48 h. Uma solução de ácido tricloroacético 50 % (v/v) foi adicionada e a mistura foi incubada por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas e secadas. A proliferação das células foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular usando sulforodamina B. Os experimentos foram feitos em triplicata, e os dados analisados usando ANOVA, e o teste F foi usado para determinar qualquer diferença entre os grupos. Doxorrubicina foi usada como controle positivo e o solvente DMSO, como controle negativo. A atividade foi expressa como a concentração capaz de causar inibição total do crescimento celular (TGI – *total growth inhibition*). Estes testes foram realizados pelo Dr. João Ernesto de Carvalho no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP).

As amostras utilizadas foram os extratos das cascas do tronco (**EH** e **EtOH**), as frações obtidas por partição (**F1**, **F2** e **F3**), a fração **F1B** obtida por VLC a partir de **F1** e as seguintes substâncias isoladas da fração **F1B**: acetato de bauerenila (**58**), 11 α H-13-diidrozaluzanin C (**44**), 10-desoxigochnatiolido A (**46**), 8-hidroxi-10-desoxigochnatiolido A (**47**), gochnatiolido A (**7**) e 8-hidroxigochnatiolido A (**48**).

4.3 – ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

No monitoramento e avaliação da atividade antioxidante foram utilizados os ensaios abaixo relacionados com o extrato **EtOH** e as frações **F1**, **F2** e **F3** das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*. Estes testes foram realizados pelo Prof. Dr. Marcos José Salvador no Instituto de Biologia da UNICAMP.

4.3.1 - Ensaio para avaliação da redução do radical DPPH

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila – Figura 124, p. 117) é estável, de coloração púrpura, e quando reduzido, passa a ter coloração amarela. Neste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, 2,6 mg das amostras (extrato **EtOH** e frações **F1**, **F2** e **F3**) foram dissolvidas em etanol (0,5 mL), obtendo-se uma solução estoque. Várias diluições foram preparadas (1,56 a 50 µg mL⁻¹) em etanol. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 µL amostra, 100 µL de tampão acetato, 100 µL de etanol e 50 µL de solução de DPPH (10 mg mL⁻¹). Decorridos 20 min. a absorbância foi medida em espectrofotômetro (λ = 517 nm) e a percentagem de atividade antirradical calculada (HUANG *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 1997). Como controles positivos foram utilizados quercetina e trolox (1,56 a 50 µg mL⁻¹) e como controle negativo o diluente. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela equação:

$$\%AA = \{[Abs \text{ controle} - (Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco})] \times 100\} / Abs \text{ controle}$$

Onde:

Abs controle é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e Abs amostra é a absorbância da mistura reacional, DPPH + amostra (SOUSA *et al.*, 2007).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2 - Ensaio ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) – Figura 125, p. 117) como fonte de radical livre (PRIOR *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2004). Os experimentos foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços com modificações (SALVADOR *et al.*, 2006). Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos e frações (50 mg mL⁻¹) em tampão fosfato/DMSO (99:1) % (v/v) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. Trolox (ácido

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico – Figura 128, p. 117) foi utilizado como padrão, sendo analisado nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM . A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda = 485\text{nm}$ e emissão $\lambda = 528\text{ nm}$) em leitor de microplaca, monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min. (temperatura = 37 °C). Os resultados foram expressos como μmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca (μM de TE g^{-1}). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.3 - Quantificação de fenólicos solúveis totais - Ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu (FCR)

As amostras foram analisadas quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (PICCINELLI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004). Para tanto, os extratos e frações foram solubilizados em metanol, sendo preparadas diluições com concentrações entre 20 e 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico – Figura 129, p. 117) elaborou-se uma curva analítica na concentração de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 ppm. A absorbância das amostras e da amostra-padrão foi medida em espectrofotômetro ($\lambda = 730\text{ nm}$) e os resultados expressos como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por quilograma de extrato ou fração em base seca (mg de GAE kg^{-1}). Como controle positivo utilizou-se o flavonóide quercetina (Figura 127, p. 117) (40 ppm) e como controle negativo o diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.4 - Análise estatística

Para cada tipo de experimento foi utilizado o teste estatístico mais adequado (ANOVA, teste de Tukey, teste *t* de Student). Os resultados foram apresentados como média (coeficiente de variação, % CV).

4.4 - DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

M1 + M2 + M3

– **acetato de lupeíla**: massa molecular ($C_{32}H_{52}O_2$) 468,76; **acetato de taraxasteíla**: massa molecular ($C_{32}H_{52}O_2$) 468,76; **acetato de pseudotaraxasteíla**: massa molecular calculada ($C_{32}H_{52}O_2$) 468,76; sólido branco; RMN 1H , ^{13}C e DEPT-135: Figuras 24 - 26 (p. 49 – 50); Tabela 8 (p. 51).

M4 + M5 + M6

– **palmitato de lupeíla**: massa molecular ($C_{46}H_{80}O_2$) 665,15; **palmitato de α -amirila**: massa molecular ($C_{46}H_{80}O_2$) 665,15; **palmitato de β -amirila**: massa molecular calculada ($C_{46}H_{80}O_2$) 665,15; sólido branco; RMN 1H e ^{13}C : Figuras 29-30 (p. 53); Tabela 9 (p. 54).

M7 + M8 + M9 + M10 + M11

– **lupeol**: massa molecular ($C_{30}H_{50}O$) 426,73; **taraxasterol**: massa molecular ($C_{30}H_{50}O$) 426,73; **pseudotaraxasterol**: massa molecular ($C_{30}H_{50}O$) 426,73; **α -amirina**: massa molecular calculada ($C_{30}H_{50}O$) 426,73; **β -amirina**: massa molecular ($C_{30}H_{50}O$) 426,73; sólido branco; RMN 1H e ^{13}C : Figuras 34 - 35 (p. 57); Tabela 10 (p. 58).

M12 + M13

– **ácido palmítico**: massa molecular calculada ($C_{16}H_{32}O_2$) 256,42, **ácido esteárico**: massa molecular ($C_{18}H_{36}O_2$) 284,48; sólido branco; RMN 1H : Figura 37 (p. 59); Cromatograma (CG-EM): Figura 38 (p. 60); Espectro de massas do componente com TR = 46,056 min (palmitato de metila - m/z 270; IR - 1922): Figura 32 (p. 55); Espectro de massas do componente com TR = 52,257 min (estearato de metila - m/z 298; IR - 2122): Figura 39 (p. 60).

M18 + M19

– **zaluzanin C**: massa molecular calculada ($C_{15}H_{18}O_3$) 246,30; **11,13- α H-diidroestafiatol (ou 11-*epi*-diidroestafiatol)**: massa molecular ($C_{15}H_{21}O_3$) 249,32; sólido branco cristalino; CLAE: TR = 13,5 min. (método 3, p. 28); RMN 1H , HSQC e HMBC: Figuras 41 – 44 (p. 63 – 64); Tabela 11 (p. 65).

M20

– **cafeato de etila**: sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{11}H_{12}O_4$) 208,21, CLAE: TR = 45,2 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , HSQC e HMBC: Figuras 73 – 76 (p. 82 – 83); Tabela 16 (p. 83).

M21

– **gochnatiolido B**: sólido branco; massa molecular calculada ($C_{30}H_{30}O_7$) 502,56, CLAE: TR = 49,0 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , HSQC E HMBC: Figuras 67 – 70 (p. 78 – 79); Tabela 15 (p. 80).

M25

– **1 α -hidroxi-11 α ,13-diidrozaluzanin C**: cristais incolores; massa molecular calculada ($C_{15}H_{20}O_4$) 264,32; ESI-AR m/z 263,1329 $[M - H]^-$ (calculado 263,1278, compatível com $C_{15}H_{19}O_4$); CLAE: TR = 28,0 min. (método 2, p. 27); $[\alpha]_D^{25} = + 184,7^\circ$ ($C = 0,002$ g. mL $^{-1}$); Raios-X: Figura 47 (p. 67); DC: Figura 48 (p. 67); RMN 1H e ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 50 – 54 (p. 68 – 69); Tabela 12 (p. 70).

M26

– **8 α -hidroxi-11 α ,13-diidrozaluzanin C**: sólido branco cristalino; massa molecular calculada ($C_{15}H_{20}O_4$) 264,32, CLAE: TR = 28,5 min. (método 2, p. 27); $[\alpha]_D^{25} = + 99,3^\circ$ ($C = 0,001$ g. mL $^{-1}$); RMN 1H , HSQC, HMBC: Figuras 56 – 58 (p. 71 – 72); Tabela 13 (p. 73).

M27

– **11 α ,13-diidroglucozaluzanin C**: sólido amarelado; massa molecular calculada ($C_{21}H_{30}O_8$) 410,45, RMN 1H , HSQC e HMBC: Figuras 61 – 63 (p. 74 – 75); Tabela 14 (p. 76).

M28

– **clorogenato de metila**: sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{17}H_{20}O_9$) 368,34; CLAE: TR = 35,3 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , HSQC, HMBC: Figuras 85 – 87 (p. 88); Tabela 17 (p. 90).

M29

– **clorogenato de etila**: sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{18}H_{22}O_9$) 382,37; CLAE: TR = 38,5 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 81 – 84 (p. 86 - 87); Tabela 17 (p. 91).

M30

– **3,4-dicafeoilquinato de etila**: sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{27}H_{28}O_{12}$) 544,50; CLAE: TR = 44,2 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 89 – 91 (p. 91); Tabela 18 (p. 99).

M31

– **3,4-dicafeoilquinato de metila:** sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{26}H_{26}O_{12}$) 530,48; CLAE: TR = 44,5 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 92 – 94 (p. 92); Tabela 19 (p. 100).

M32

– **3,5-dicafeoilquinato de etila:** massa molecular calculada ($C_{27}H_{28}O_{12}$) 544,50; sólido cristalino incolor; CLAE: TR = 43,2 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 95 – 97 (p. 93); Tabela 18 (p. 99).

M33

– **4,5-dicafeoilquinato de etila:** massa molecular calculada ($C_{27}H_{28}O_{12}$) 544,50; sólido cristalino incolor; CLAE: TR = 43,2 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 92 – 95 (p. 98 - 100); Tabela 18 (p. 99).

M34

– **ácido 3,5-dicafeoilquínico:** sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{25}H_{24}O_{12}$) 516,45; CLAE: TR = 42,7 min. (método 2, p. 27); RMN 1H : Figuras 104 - 106 (p. 96); Tabela 20 (p. 101).

M35

– **3,4-dicafeoilquinato de metila:** sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{26}H_{26}O_{12}$) 530,48; CLAE: TR = 44,0 min. (método 2, p. 27); RMN 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC: Figuras 101 – 103 (p. 95); Tabela 19 (p. 100).

M36

– **ácido 4,5-dicafeoilquínico:** sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{25}H_{24}O_{12}$) 516,45; CLAE: TR = 39,6 min. (método 2, p. 27); RMN 1H : Figuras 107 – 109 (p. 97); Tabela 20 (p. 101).

M37

– **ácido 3,4-dicafeoilquínico:** sólido cristalino incolor; massa molecular calculada ($C_{25}H_{24}O_{12}$) 516,45; CLAE: TR = 41,7 min. (método 2, p. 27); RMN 1H : Figuras 110 – 112 (p. 98); Tabela 20 (p. 101).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Identificação dos constituintes das flores de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

O fracionamento cromatográfico das flores *M. polymorphum* subsp. *floccosum* resultou no isolamento e identificação de 15 substâncias codificadas como **M1**, **M2**, **M3**, **M4**, **M5**, **M6**, **M7**, **M8**, **M9**, **M10**, **M11**, **M12**, **M13**, **M14** e **M15**. Todas são conhecidas e foram identificadas através de análise de espectros de RMN, comparação com dados da literatura, e em alguns casos, derivatização química e CG-EM. As substâncias **M14** (sitosterol) e **M15** (estigmasterol) são muito comuns, tendo sido isoladas desta planta em um trabalho anterior e, por isso não serão discutidas aqui (STRAPASSON, 2010).

É importante ressaltar que todos os compostos isolados das flores, com exceção de **M12** e **M13**, são triterpenos, obtidos em misturas, a partir da fração em CH₂Cl₂. Essa é uma situação bastante comum no fracionamento de extratos vegetais ricos em triterpenos, quando são usadas técnicas clássicas como cromatografia em gel de sílica, tanto em coluna como em camada delgada.

Os espectros de RMN de ¹H de triterpenos geralmente fornecem poucas informações sobre a estrutura desses compostos, sendo mais úteis os espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135. O número de triterpenos conhecidos é muito grande, mas é possível fazer algumas generalizações que auxiliam na identificação. A maioria dos triterpenos encontrados nos extratos vegetais são pentacíclicos ou tetracíclicos, contendo apenas uma oxigenação no C-3 e uma ligação dupla, de modo que o deslocamento químico dos carbonos olefínicos permite deduzir o esqueleto (OLEA & ROQUE, 1990). Sendo assim, a caracterização das substâncias nas misturas foi baseada principalmente na análise dos espectros de RMN de ¹³C, que apresenta um padrão característico e inconfundível de deslocamentos químicos de carbonos sp² de cada esqueleto triterpênico oxigenado em C-3 (DIAZ *et al.*, 2008).

5.1.1 – Identificação das substâncias **M1**, **M2** e **M3**

As substâncias **M1**, **M2** e **M3** foram obtidas juntas, como um sólido branco, que deu uma única mancha quando analisado por CCDA. O seu espectro de RMN de ¹H (Figura 24, p. 49) mostrou sinais de hidrogênios olefínicos em δ 4,68 (*d*, 2,2 Hz, 1H) e δ 4,56 (*dd*, 2,2 Hz; 1,2 Hz, 1H), atribuídos à **M1**; em δ 4,61 (*dd*, 2,2 Hz; 1,2 Hz, 1H) (**M2**) e em δ 5,26 (*m*, 1H) (**M3**). Também foram observados sinais de hidrogênios oximetínicos

em δ 4,44 (*m*) e dois simpletos em δ 2,05 correspondentes aos grupos acetila, além de uma região alifática com uma grande sobreposição de sinais atribuída aos diversos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25, p. 50) apresentou 67 sinais, caracterizando a presença de uma mistura de triterpenos. Os sinais em δ 21,3; 81,0 e 171,0 são característicos, respectivamente, de carbonos metílicos, oximetínicos e carbonílicos em triterpenos acetilados. A presença de três diferentes triterpenos foi sugerida pelos sinais de seis carbonos olefínicos. Neste caso, os sinais em δ 107,1 e 154,7 são característicos do esqueleto urs-20(30)-eno (**M2**); os sinais em δ 118,9 e 139,9 correspondem ao esqueleto urs-20-eno (**M3**), enquanto que os sinais em δ 109,3 e 151,0 caracterizam o esqueleto lup-20(29)eno (**M1**) (Tabela 8, p. 51) (OLEA & ROQUE, 1990).

Através da comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; SILVA *et al.*, 1998) foram identificados os acetatos de lupeíla (**M1**), taraxasteíla (**M2**) e pseudotaraxasteíla (**M3**) (Figura 23, p. 49).

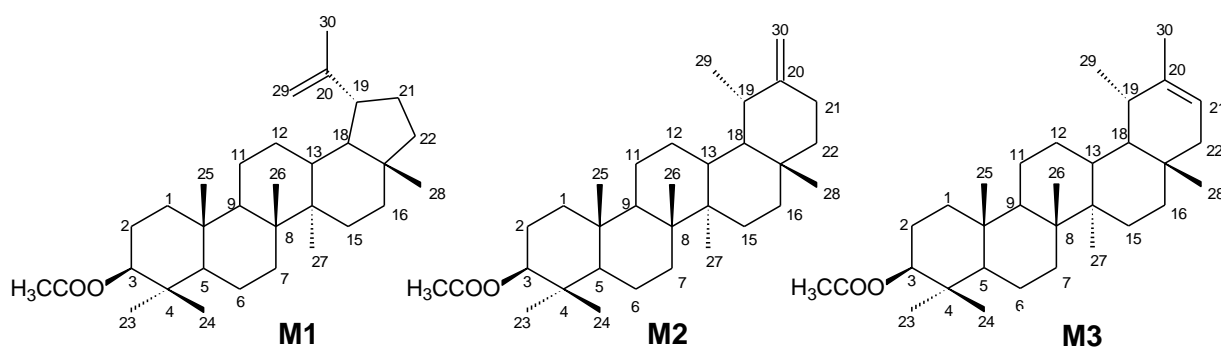


Figura 23 – Estruturas dos triterpenos **M1** (acetato de lupeíla), **M2** (acetato de taraxasteíla) e **M3** (acetato de pseudotaraxasteíla).

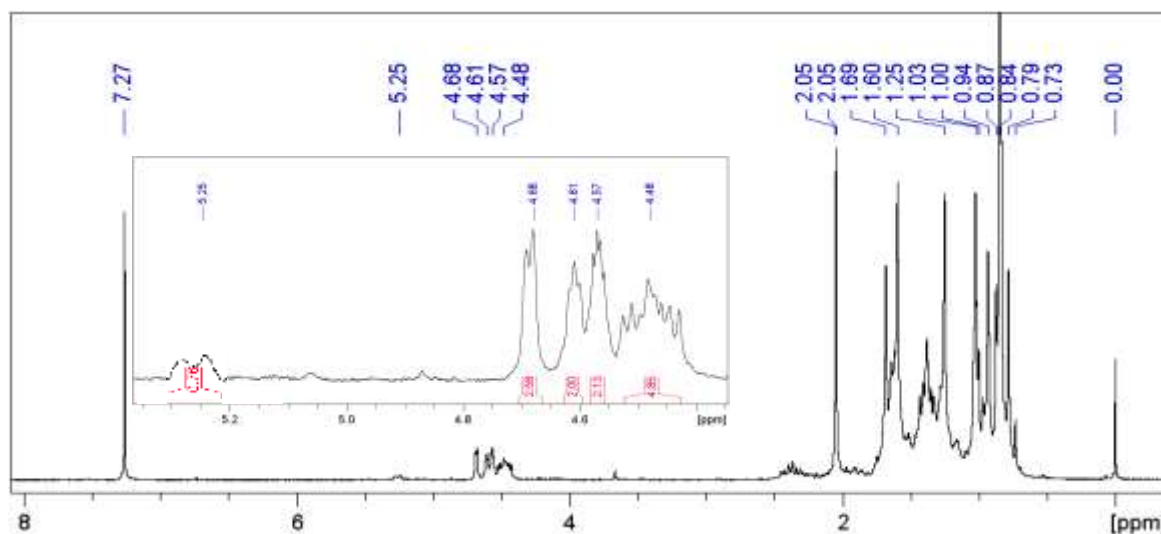


Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de **M1**, **M2** e **M3**.

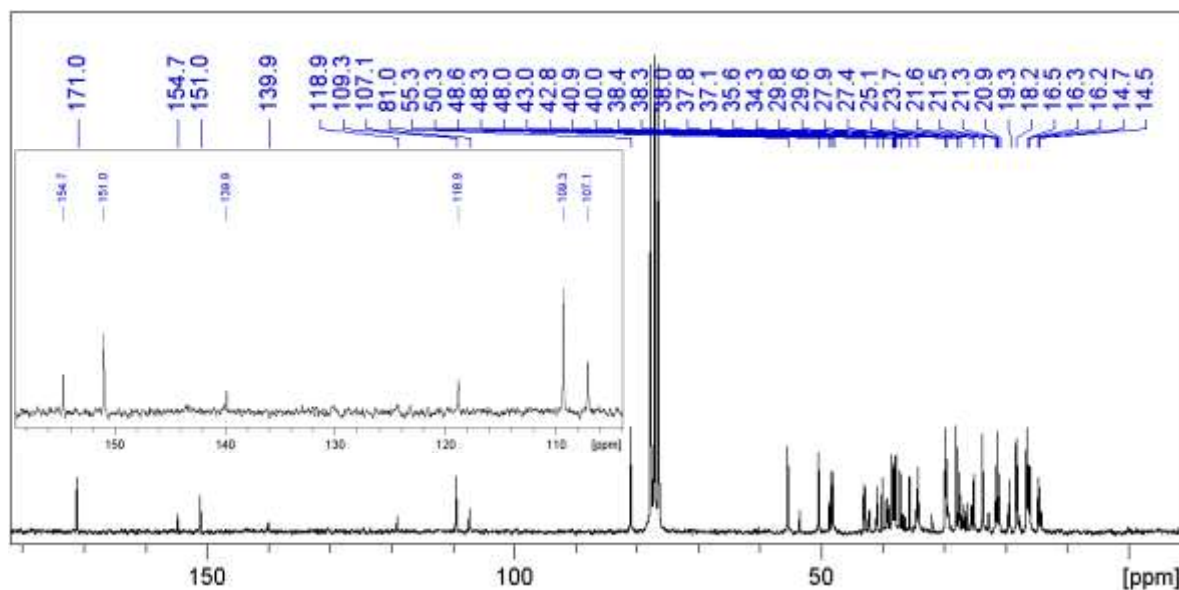


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) da mistura de **M1**, **M2** e **M3**.

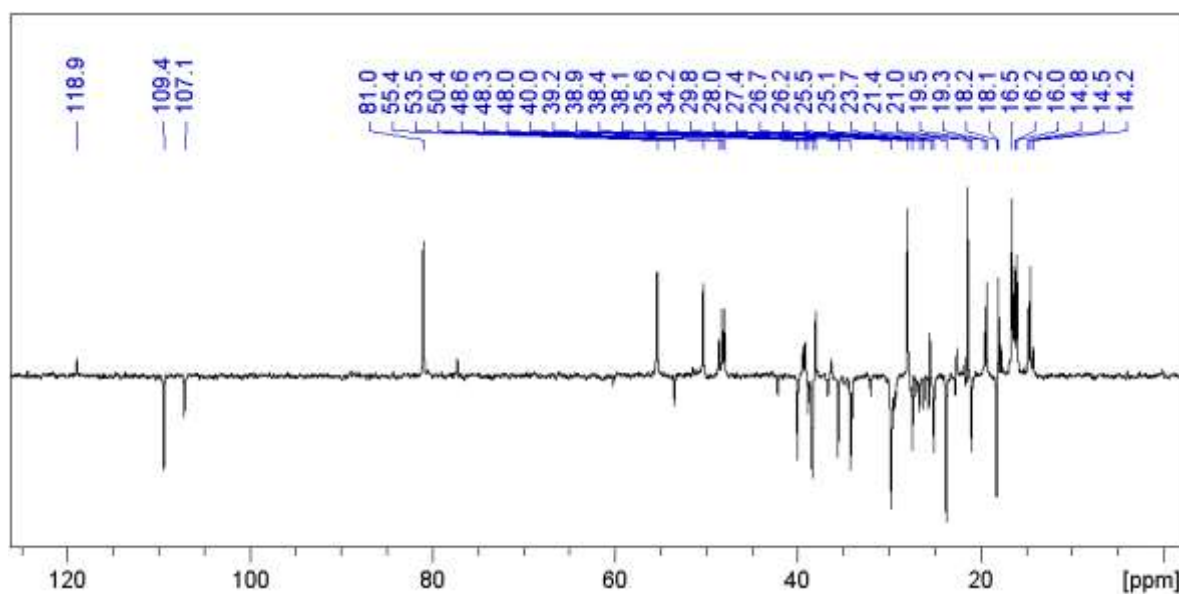


Figura 26 – Espectro de RMN de DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) da mistura de **M1**, **M2** e **M3**

Tabela 8 – Dados de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) de **M1** (acetato de lupeíla), **M2** (acetato de taraxasterila) e **M3** (acetato de pseudotaraxasterila).

Posição	M1		M2		M3	
	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}
1	CH_2	38,4	CH_2	38,4	CH_2	38,4
2	CH_2	23,7	CH_2	23,7	CH_2	23,7
3	CH	81,0	CH	81,0	CH	81,0
4	C	37,8	C	37,8	C	37,8
5	CH	55,4	CH	55,4	CH	55,4
6	CH_2	18,2	CH_2	18,2	CH_2	18,2
7	CH_2	34,2	CH_2	34,0	CH_2	34,4
8	C	40,8	C	40,8	C	41,1
9	CH	50,4	CH	50,4	CH	50,3
10	C	37,0	C	37,0	C	37,0
11	CH_2	21,3	CH_2	21,3	CH_2	21,3
12	CH_2	25,1	CH_2	26,1	CH_2	27,6
13	CH	38,0	CH	39,2	CH	39,2
14	C	43,0	C	42,0	C	42,3
15	CH_2	27,4	CH_2	26,6	CH_2	27,0
16	CH_2	35,6	CH_2	38,3	CH_2	36,7
17	C	43,0	C	34,5	C	34,5
18	CH	48,3	CH	48,6	CH	48,6
19	CH	48,0	CH	39,4	CH	36,3
20	C	151,0	C	154,7	C	139,9
21	CH_2	29,8	CH_2	25,6	CH	118,9
22	CH_2	40,0	CH_2	38,9	CH_2	42,2
23	CH_3	27,9	CH_3	27,9	CH_3	27,9
24	CH_3	16,5	CH_3	15,9	CH_3	15,9
25	CH_3	16,2	CH_3	16,0	CH_3	16,0
26	CH_3	16,3	CH_3	16,5	CH_3	16,5
27	CH_3	14,5	CH_3	14,7	CH_3	14,7
28	CH_3	18,0	CH_3	19,5	CH_3	17,7
29	CH_2	109,3	CH_3	25,5	CH_3	22,5
30	CH_3	19,3	CH_2	107,1	CH_3	21,6
1'	C	171,0	C	171,0	C	171,0
2'	CH_3	21,3	CH_3	21,3	CH_3	21,3

Atribuições baseadas na análise dos espectros e em dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; SILVA *et al.*, 1998).

5.1.2 – Identificação das substâncias M4, M5 e M6

As substâncias **M4**, **M5** e **M6** também foram obtidas em mistura como um sólido branco. O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 29, p. 53) mostrou sinais de hidrogênios olefínicos na região de δ 4,69 (*d*, 2,2 Hz, 1H) e δ 4,57 (*dd*, 2,2 Hz e 1,2 Hz, 1H), de hidrogênios oximetínicos em δ 4,43 (*m*, 1H), de diversos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Não foram observados sinais de grupos acetila, mas o sinal intenso em δ 1,25 sugeriu a presença de uma longa cadeia alifática.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30, p. 53) apresentou mais que 60 sinais, caracterizando a presença de uma mistura de triterpenos, como na amostra anterior. O sinal em δ 80,6, referente a carbono oxigenado, é característico de triterpeno esterificado, porém, o grupo carbonila se mostrou mais desprotegido que anteriormente, aparecendo em δ 173,7. Todos esses dados indicaram uma mistura de triterpenos esterificados com ácidos de cadeia longa. A presença de sinais de seis carbonos olefínicos indicou a presença de três triterpenos tipo lup-20(29)eno (δ 109,4 e 151,0) (**M4**); urs-12-eno (δ 124,4 e 139,6) (**M5**); e olean-12-eno (δ 121,7 e 145,3) (**M6**) (Tabela 9, p. 54) (OLEA & ROQUE, 1990).

A fim de identificar os ácidos graxos, esta mistura foi submetida à reação de transesterificação (figura 27, p. 52) com NaOH/MeOH 0,5 mol L $^{-1}$, de acordo com a metodologia usual (MENDES *et al.*, 1999). Como produtos de reação foram obtidos duas frações, uma contendo os álcoois triterpênicos e outra contendo ésteres metílicos de ácidos graxos. Esta última foi analisada através de CG-EM, apresentando em seu cromatograma (Figura 31, p. 55) apenas um componente, com índice de retenção calculado de 1922, e espectro de massas (Figura 32, p. 55) típico de éster de ácido graxo. Através de comparação com dados da literatura esse composto foi identificado como palmitato de metila (ADAMS, 2007). Estes resultados mostraram que a mistura era constituída dos palmitatos de lupeíla (**M4**), α -amirila (**M5**) e β -amirila (**M6**) (Figura 28, p. 53). Misturas de composição semelhante já foram identificadas em *Vernonia tweediana*, outra espécie da família Asteraceae (DIAZ *et al.*, 2008).

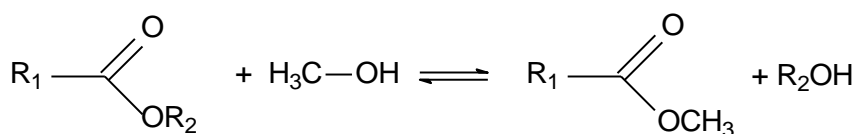


Figura 27 – Reação geral de transesterificação (MENDES *et al.*, 1999).

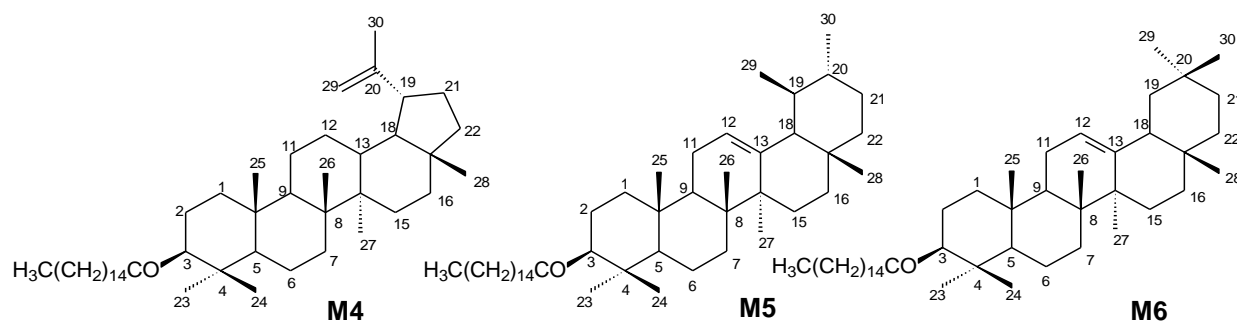


Figura 28 – Estruturas dos triterpenos **M4** (palmitato de lupeíla), **M5** (palmitato de α-amirila) e **M6** (palmitato de β-amirila).

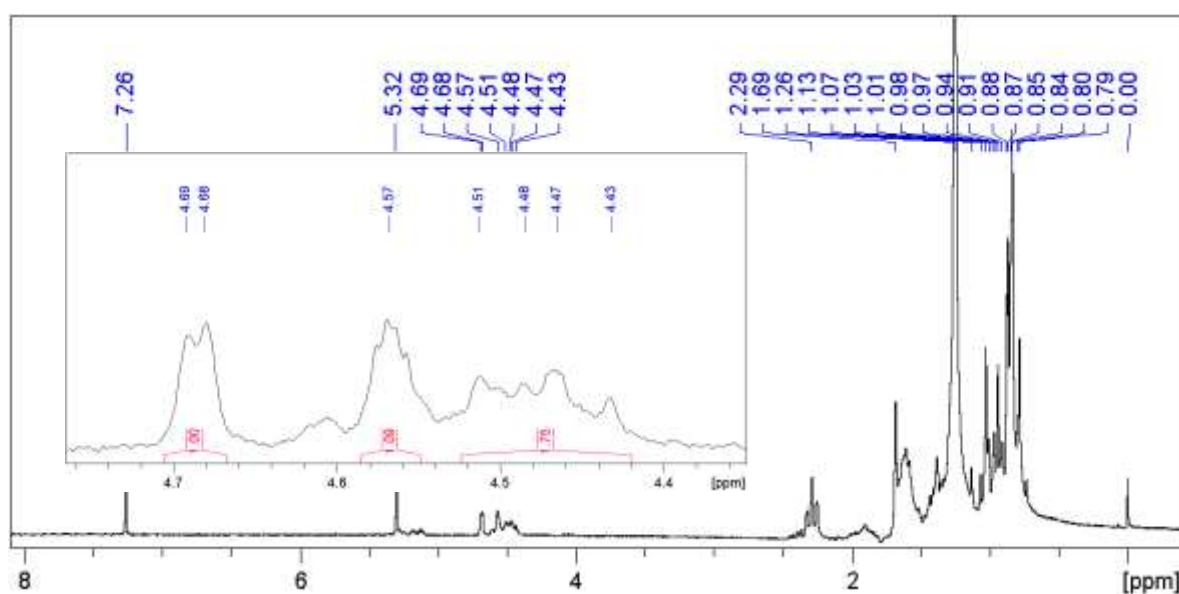


Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de **M4**, **M5** e **M6**.

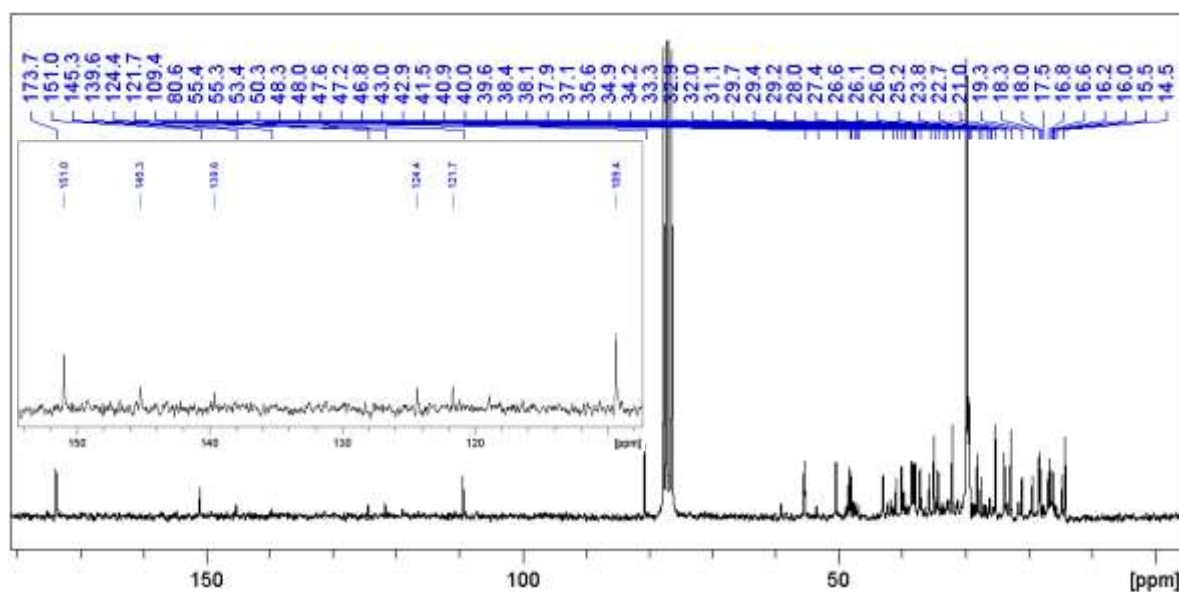


Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) da mistura de **M4**, **M5** e **M6**.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) de **M4** (palmitato de lupeíla), **M5** (palmitato de α -amirila) e **M6** (palmitato de β -amirila).

Posição	M4		M5		M6	
	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}
1	CH_2	38,3	CH_2	38,4	CH_2	38,4
2	CH_2	22,6	CH_2	23,3	CH_2	23,6
3	CH	80,6	CH	80,6	CH	80,6
4	C	37,8	C	37,8	C	37,8
5	CH	55,3	CH	55,3	CH	55,2
6	CH_2	18,3	CH_2	18,3	CH_2	18,3
7	CH_2	34,4	CH_2	32,0	CH_2	32,0
8	C	40,8	C	39,8	C	41,0
9	CH	50,3	CH	47,6	CH	47,6
10	C	37,1	C	36,8	C	36,8
11	CH_2	20,9	CH_2	23,8	CH_2	23,8
12	CH_2	23,7	CH	124,4	CH	121,7
13	CH	38,0	C	139,6	C	145,3
14	C	43,0	C	41,7	C	41,7
15	CH_2	27,4	CH_2	29,1	CH_2	26,1
16	CH_2	35,5	CH_2	26,6	CH_2	27,0
17	C	42,8	C	33,7	C	32,5
18	CH	48,3	CH	59,0	CH	47,6
19	CH	48,0	CH	39,6	CH_2	46,7
20	C	151,1	CH	39,6	C	31,0
21	CH_2	29,8	CH_2	31,2	CH_2	34,8
22	CH_2	40,0	CH_2	41,5	CH_2	38,2
23	CH_3	27,9	CH_3	28,0	CH_3	28,0
24	CH_3	16,5	CH_3	15,5	CH_3	15,5
25	CH_3	16,2	CH_3	15,5	CH_3	15,7
26	CH_3	16,7	CH_3	16,7	CH_3	16,7
27	CH_3	14,5	CH_3	23,1	CH_3	25,9
28	CH_3	18,0	CH_3	28,0	CH_3	28,4
29	CH_2	109,4	CH_3	17,4	CH_3	33,7
30	CH_3	19,2	CH_3	21,4	CH_3	23,7
1'	C	173,7	C	173,7	C	173,7
2'	CH_3	29,7	CH_3	29,7	CH_3	29,7

Atribuições baseadas em dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONTE *et al.*, 2001).

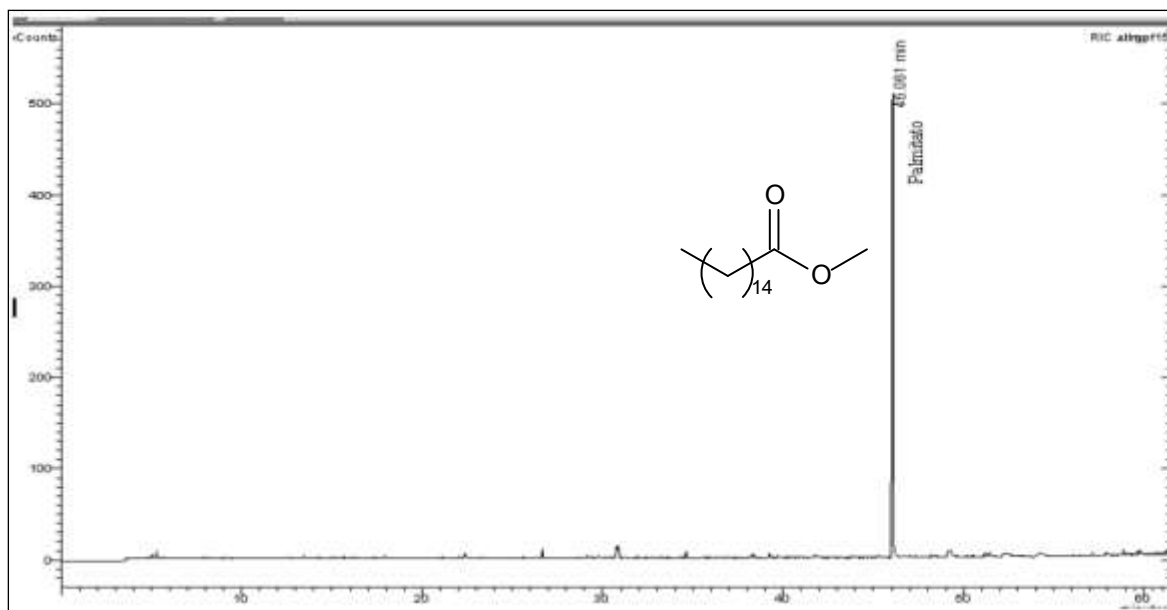


Figura 31 – Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos obtidos por transesterificação da mistura de **M4**, **M5** e **M6**. O índice de retenção calculado foi de 1922, enquanto que a literatura registra 1921 para o palmitato de metila (ADAMS, 2007).

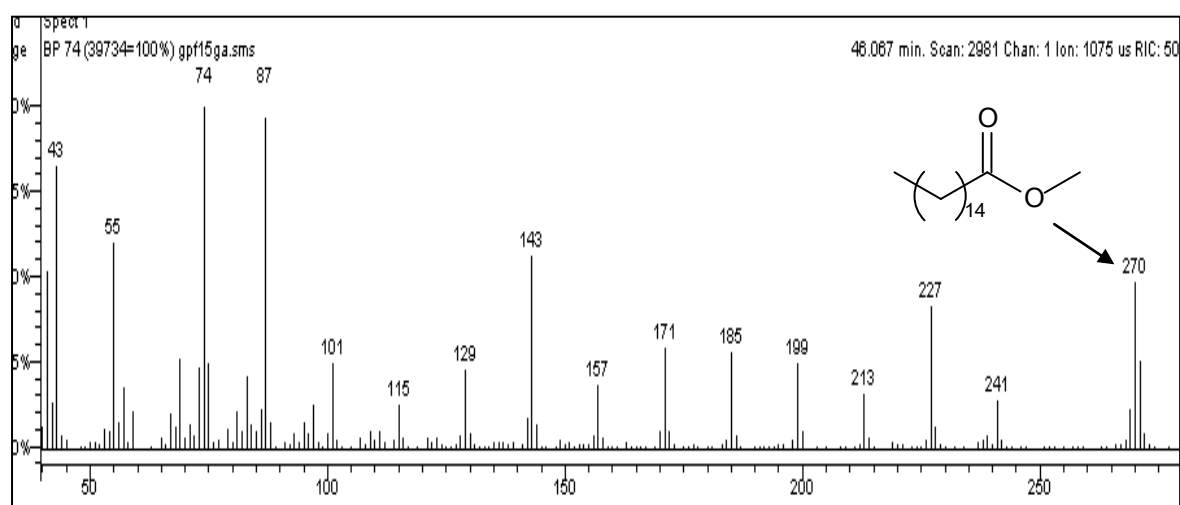


Figura 32 – Espectro de massas do componente observado no cromatograma da figura 31 (p. 54), compatível com palmitato de metila (ADAMS, 2007).

5.1.3 – Identificação das substâncias M7, M8, M9, M10 e M11

As substâncias **M7**, **M8**, **M9**, **M10** e **M11** também foram isoladas juntas como um sólido branco. O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 34, p. 57) mostrou sinais de hidrogênios oximetínicos em δ 3,22, de hidrogênios olefínicos na região de δ 4,57 a δ 5,13, e de diversos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Não foram observados sinais de grupos acetila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35, p. 57) apresentou vários sinais de C-sp³ e 10 picos referentes a carbonos olefínicos, caracterizando a presença de uma mistura de cinco triterpenos dos tipos lup-20(29)-eno (δ 109,3 e 151,0), urs-20(30)-eno (δ 107,1 e 154,9), urs-20-eno (δ 118,9 e 139,6), urs-12-eno (δ 124,4 e 139,9) e olean-12-eno (δ 121,7 e 145,2). Em adição, foi observado um sinal em δ 79,0 característico de carbono oxigenado de álcool triterpênico com grupo hidroxila na orientação β (OLEA & ROQUE, 1990).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 34, p. 57), alguns conjuntos de sinais confirmam a presença dos triterpenos lupeol (**M7**) pelos sinais em δ 4,57 (*q*, 1,3 Hz, 1H), δ 4,69 (*dl*, 2,4 Hz, 1H); taraxasterol (**M8**) pelo sinal em δ 4,62 (*dt*, 6,9; 2,4, 2H); pseudotaraxasterol (**M9**) pelo sinal em δ 5,25 (*dl*, 6,9 Hz, 1H); α -amirina (**M10**) pelo sinal em δ 5,18 (*t*, 3,6 Hz, 1H) e β -amirina (**M11**) através do sinal em δ 5,13 (*t*, 3,7 Hz, 1H). Os dados de RMN de ^{13}C estão de acordo com a literatura (Tabela 10, p. 58) (MAHATO & KUNDU, 1994).

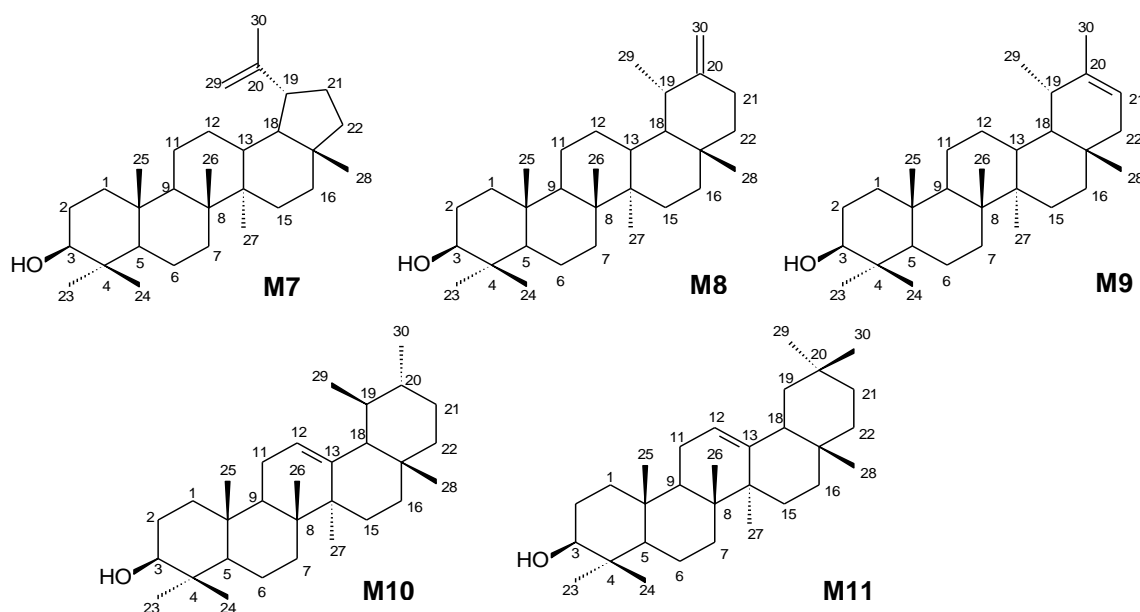


Figura 33 – Estruturas dos triterpenos **M7** (lupeol), **M8** (taraxasterol), **M9** (pseudotaraxasterol), **M10** (α -amirina) e **M11** (β -amirina).

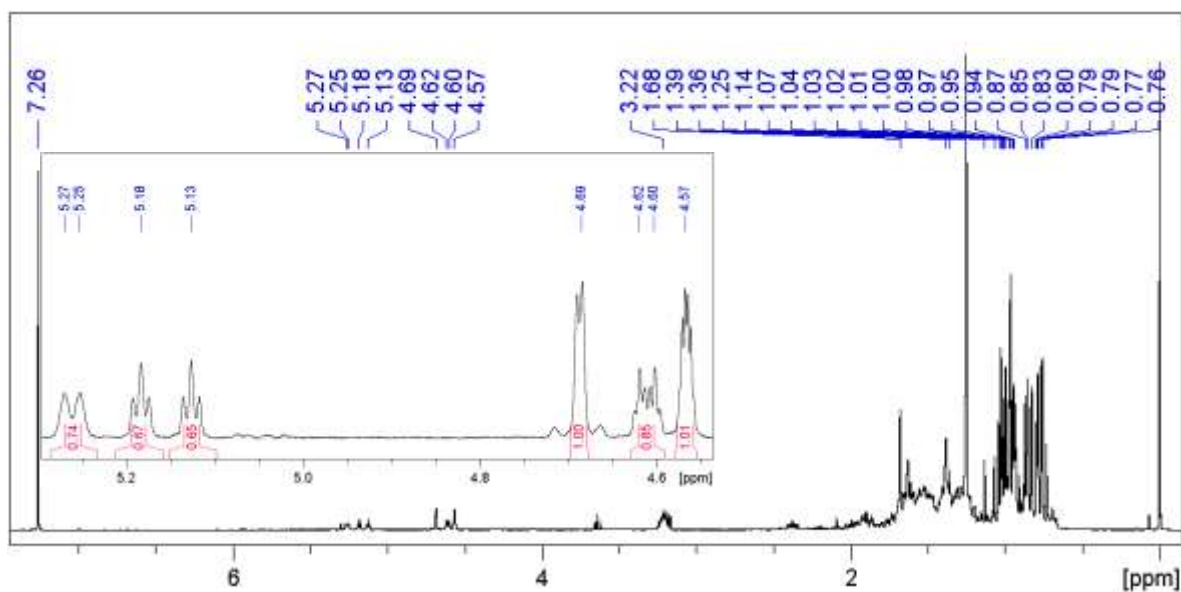


Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de **M7**, **M8**, **M9**, **M10** e **M11**.

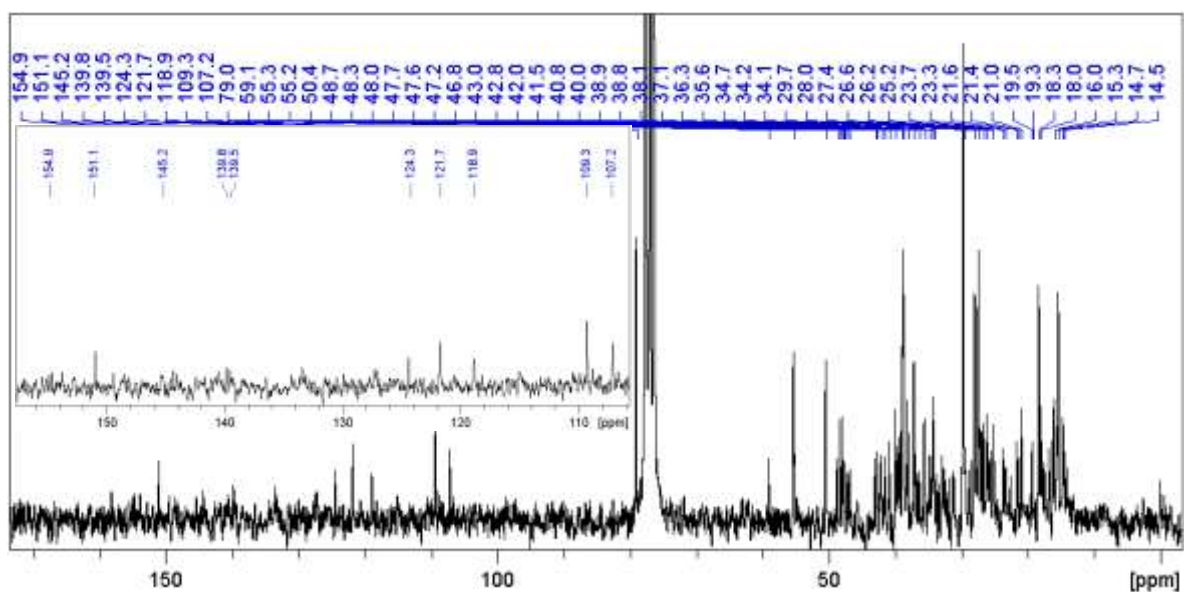


Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) da mistura de **M7**, **M8**, **M9**, **M10** e **M11**.

Tabela 10 – Dados de RMN de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CDCl_3) dos triterpenos **M7** (lupeol), **M8** (taraxasterol), **M9** (pseudotaraxasterol), **M10** (α -amirina) e **M11** (β -amirina).

Posição	M7		M8		M9		M10		M11	
	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}	tipo	δ_{C}
1	CH_2	38,8	CH_2	38,8	CH_2	38,8	CH_2	38,6	CH_2	38,8
2	CH_2	27,4	CH_2	27,4	CH_2	27,4	CH_2	27,3	CH_2	27,3
3	CH	79,0	CH	79,0	CH	79,0	CH	79,0	CH	79,0
4	C	38,9	C	38,8	C	38,9	C	38,8	C	38,8
5	CH	55,3	CH	55,3	CH	55,3	CH	55,2	CH	55,2
6	CH_2	18,3	CH_2	18,3	CH_2	18,3	CH_2	18,3	CH_2	18,3
7	CH_2	34,1	CH_2	34,1	CH_2	34,3	CH_2	32,9	CH_2	32,9
8	C	40,8	C	40,8	C	41,1	C	40,0	C	38,8
9	CH	50,4	CH	50,4	CH	50,4	CH	47,6	CH	47,6
10	C	37,1	C	37,1	C	37,1	C	36,9	C	37,7
11	CH_2	20,9	CH_2	21,4	CH_2	21,6	CH_2	23,3	CH_2	23,5
12	CH_2	25,1	CH_2	26,2	CH_2	27,6	CH	124,3	CH	121,7
13	CH	38,1	CH	39,2	CH	39,2	C	139,8	C	145,2
14	C	42,9	C	42,1	C	42,9	C	42,1	C	41,7
15	CH_2	27,4	CH_2	26,6	CH_2	27,0	CH_2	28,7	CH_2	26,2
16	CH_2	35,6	CH_2	38,3	CH_2	36,7	CH_2	26,6	CH_2	26,9
17	C	43,0	C	34,5	C	34,4	C	33,7	C	32,5
18	CH	48,3	CH	48,7	CH	48,7	CH	59,1	CH	47,2
19	CH	47,7	CH	39,4	CH	36,3	CH	39,6	CH_2	46,8
20	C	151,1	C	154,9	C	139,8	CH	39,8	C	31,1
21	CH_2	29,9	CH_2	25,6	CH	118,9	CH_2	31,2	CH_2	34,7
22	CH_2	40,0	CH_2	38,9	CH_2	42,2	CH_2	41,6	CH_2	37,1
23	CH_3	28,0	CH_3	28,0	CH_3	28,0	CH_3	28,1	CH_3	28,4
24	CH_3	15,4	CH_3	15,4	CH_3	15,4	CH_3	15,6	CH_3	15,5
25	CH_3	16,1	CH_3	16,8	CH_3	16,3	CH_3	15,6	CH_3	15,7
26	CH_3	16,1	CH_3	15,9	CH_3	16,0	CH_3	16,9	CH_3	16,9
27	CH_3	14,6	CH_3	14,7	CH_3	14,7	CH_3	23,3	CH_3	26,0
28	CH_3	18,3	CH_3	19,5	CH_3	17,7	CH_3	28,1	CH_3	28,4
29	CH_2	109,3	CH_3	25,5	CH_3	22,5	CH_3	17,5	CH_3	33,3
30	CH_3	19,3	CH_2	107,1	CH_3	21,6	CH_3	21,4	CH_3	23,7

Atribuições baseadas em dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

5.1.4 – Identificação das substâncias M12 e M13

As substâncias **M12** e **M13** foram identificadas em uma mistura que se apresentou como um sólido branco. Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 37, p. 59) mostrou o perfil típico de uma substância alifática de cadeia longa, possivelmente um ácido graxo saturado. Após derivatização desta amostra através da reação de esterificação (Figura 36, p. 59), o produto foi analisado por Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massas.

O cromatograma (CG-EM) (Figura 38, p. 60) mostrou picos característicos de ésteres metílicos. Em particular, foram registrados dois picos majoritários com diferentes tempos de retenção, sendo que cada um deles deu origem a um espectro de massas (Figura 32, p. 55; Figura 39, p. 60) cujos íons moleculares em m/z 270 $[\text{M}]^+$ e 298 $[\text{M}]^+$ e fragmentos correspondem ao palmitato de metila (tempo de retenção $\text{TR} = 46,056$) e ao estearato de metila (tempo de retenção $\text{TR} = 52,257$), respectivamente. Os índices de retenção calculados para estes compostos foram de 1922 e 2122, enquanto que a literatura registra 1921 e 2124, respectivamente (ADAMS, 2007). Os demais picos observados não foram identificados.

Dessa forma as substâncias presentes na mistura foram identificadas como os ácidos palmítico (**M12**) e esteárico (**M13**).

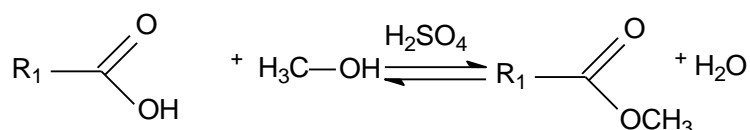


Figura 36 – Reação geral de esterificação de ácido graxo.

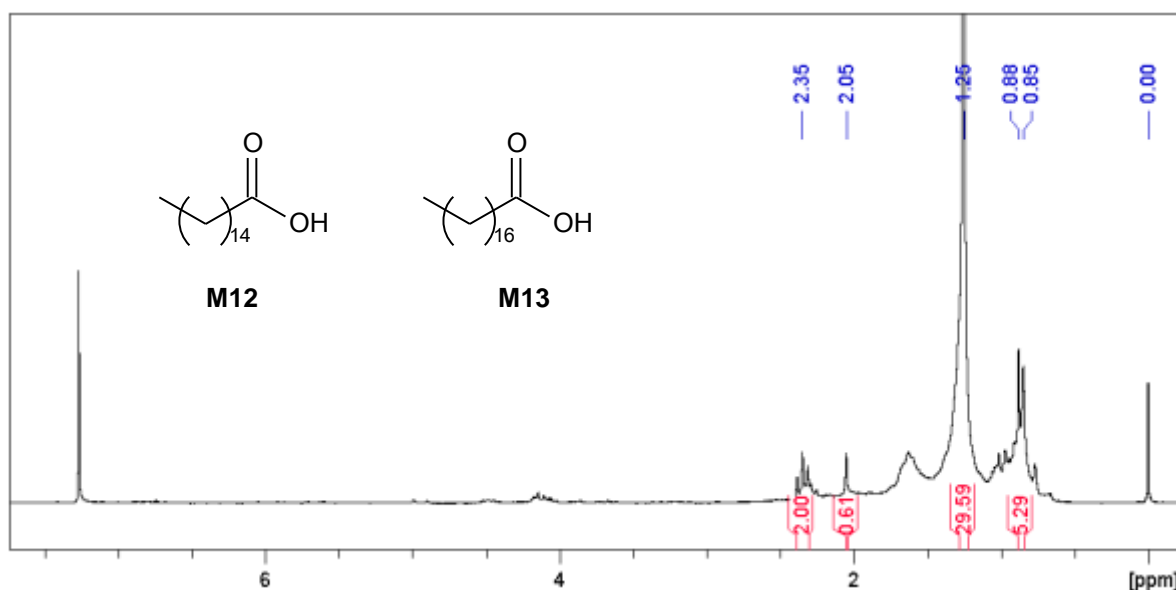


Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura de **M12** e **M13**.

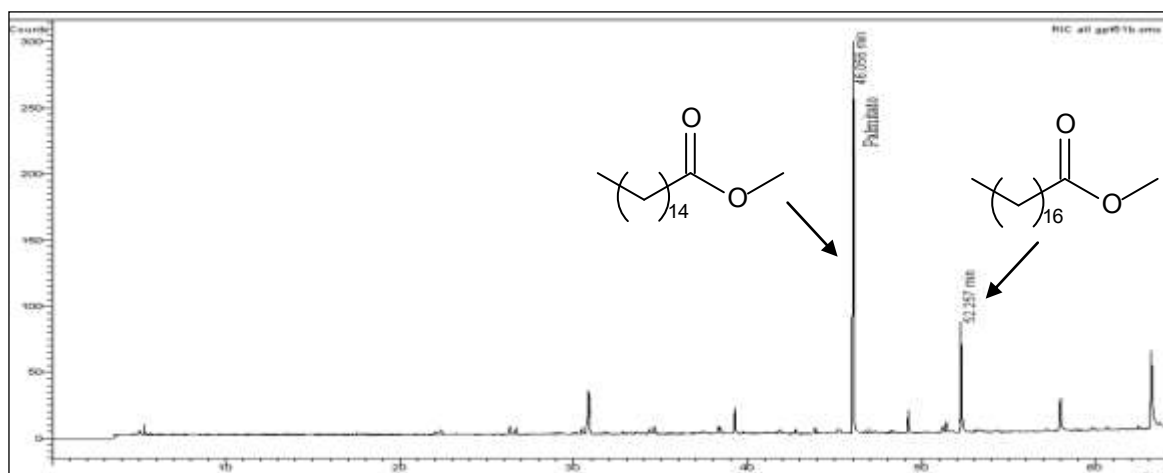


Figura 38 – Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos palmitato de metila (TR: 46,056 min.) e estearato de metila (TR: 52,257 min.).

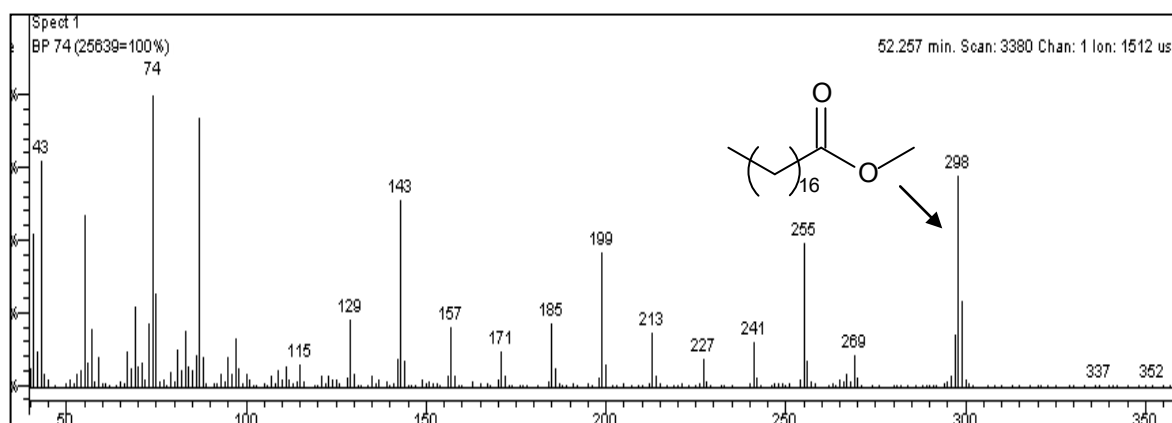


Figura 39 – Espectro de massas do componente com TR = 52,257 min. (estearato de metila) (ADAMS, 2007).

5.2 - Identificação dos constituintes das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*

Como já mencionado, este trabalho dá continuidade ao estudo fitoquímico das cascas do tronco iniciado anteriormente. Nesta etapa foram estudadas as frações **F1C**, **F1D**, **F2A**, **F2B** e **F3** (Esquemas 6 - 10, p. 38 - 41). O fracionamento cromatográfico dessas frações resultou no isolamento de 23 substâncias codificadas como **M14**, **M15**, **M16**, **M17**, **M18**, **M19**, **M20**, **M21**, **M22**, **M23**, **M24**, **M25**, **M26**, **M27**, **M28**, **M29**, **M30**, **M31**, **M32**, **M33**, **M34**, **M35**, **M36** e **M37**, as quais foram identificadas através de análise de espectros de RMN e comparação com dados da literatura e de substâncias previamente isoladas dessa planta.

As substâncias **M14**, **M15**, **M16**, **M17**, **M22**, **M23** e **M24** haviam sido isoladas da fração anterior (**F1B**) desse mesmo extrato, sendo identificadas como sitosterol (**M14**), estigmasterol (**M15**), 10-desoxigochnatiolido A (gochnatiolido C) (**M16**), 11 α H-13-diidrozaluzanin C (**M17**), gochnatiolido A (**M22**), 8-hidroxigochnatiolido A (**M23**) e 8-hidroxi-10-desoxigochnatiolido A (8-hidroxigochnatiolido C) (**M24**) (STRAPASSON, 2010). As demais substâncias que foram isoladas somente neste trabalho serão discutidas por classes, a seguir.

5.2.1 – Identificação das substâncias **M18** e **M19**

As substâncias **M18** e **M19** foram identificadas em mistura como um sólido branco cristalino.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 41 - 42, p. 63) dessa mistura mostrou sinais característicos de oito hidrogênios olefínicos, sendo dois deles típicos de uma ligação dupla exocíclica ao anel lactônico (δ 6,21, *d*, 3,2 Hz e δ 5,49, *d*, 3,2 Hz) e quatro característicos de uma ligação dupla exocíclica em C-10 do esqueleto guaiano (δ 5,01, 4,95, 4,91 e 4,90). Os dois sinais remanescentes (δ 5,47, *t*, 2,1 Hz e δ 5,33, *t*, 2,1 Hz), 5,01 (*t*, 1,2 Hz; 1H) pertenciam a outra ligação dupla exocíclica. Além disso, esse espectro mostrou a presença de quatro hidrogênios oximetínicos (δ 4,58, *m*; 4,10, *dd*, 8,9 Hz; 8,8 Hz; 4,05, *dd*, 8,9 Hz; 8,8 Hz; 3,71, *m*), vários multipletos referentes a hidrogênios metilênicos e metínicos e dois sinais intensos em δ 1,21 (*d*, 6,3 Hz; 3H) e δ 1,15 (*d*, 7,8 Hz; 3H) referentes a dois grupos metila ligados a carbono sp^3 . Esses dados indicaram uma mistura de dois guaianolídeos ou um guaianolídeo dimérico.

Pela análise dos mapas de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (experimento HSQC - Figura 43, p. 64) e a longa distância (experimento HMBC - Figura 44, p. 64) foi possível observar quatro sinais em δ 83,8; 85,7; 170,0 e 179,8, caracterizando dois anéis

lactônicos. Os sinais em δ 73,6 e 78,3 indicaram a presença de dois álcoois secundários. Os demais sinais mostraram tratar-se de duas lactonas sesquiterpênicas com esqueleto guaiano. A análise cuidadosa dos demais sinais e das correlações observadas nos espectros bidimensionais (Tabela 11, p. 65; Figura 45, p. 65) possibilitou a separação dos sinais em dois conjuntos independentes, que levaram às estruturas **M18** e **M19** (Figura 40, p. 62). A configuração relativa foi deduzida a partir dos dados de RMN e comparação com dados da literatura. Em **M18** e **M19**, H-6 é um duplo-duplete com constantes de acoplamento de 8,9 Hz, indicando uma relação *trans* com H-6 e H-7. Por outro lado, o deslocamento químico de C-3 (δ 73,6) em **M-18** é característico do grupo hidroxila em β nesse tipo de substância (KUMARI *et al.*, 2003). O sinal de H-3 é um multiplete nas duas substâncias, mostrando que ambas devem ter a mesma configuração relativa em C-3. Assim, **M18** foi identificada como zaluzanin C (KUMARI *et al.*, 2003), uma lactona previamente isolada de *Moquinistrum bolivianum* (BOHLMAN & ZDERO, 1979). A lactona **M19** difere de **M18** pela substituição dos grupos metilênicos em C-4 e C-11 por grupos metila, gerando mais dois estereocentros (Figura 40, p. 62). Revisando a literatura, foram encontradas duas substâncias com essa estrutura plana. A primeira, denominada diidroestafiatol, apresenta os dois grupos metila em α , com deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C em δ 13,0 (C-13) e δ 14,1 (C-15) (KUMARI *et al.*, 2003). Na segunda, 4-*epi*-diidroestafiatol, esses deslocamentos químicos são observados em δ 13,5 (C-13) e δ 8,3 (C-15) (ZHU *et al.*, 2010). Comparando-se esses valores com aqueles encontrados para **M19** (Tabela 11, p. 65) nota-se que C-15 deve estar em α (δ 13,1), mas C-13 deve estar em β (δ 11,0). Portanto **M19** é um novo guaianolídeo, sendo denominado 11,13- α H-diidroestafiatol (ou 11-*epi*-diidroestafiatol).

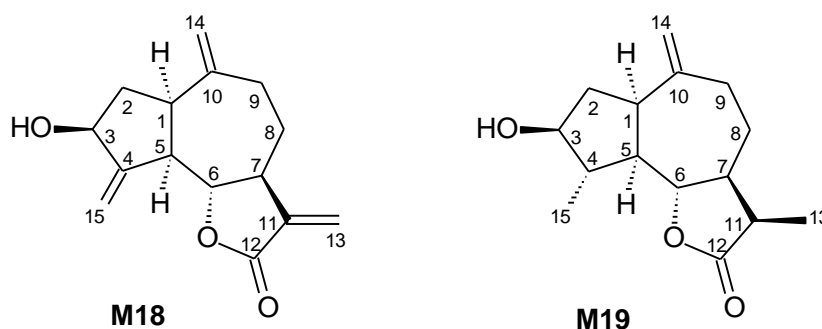


Figura 40 – Estruturas das substâncias **M18** (zaluzanin C) e **M19** (11,13- α H-diidroestafiatol).

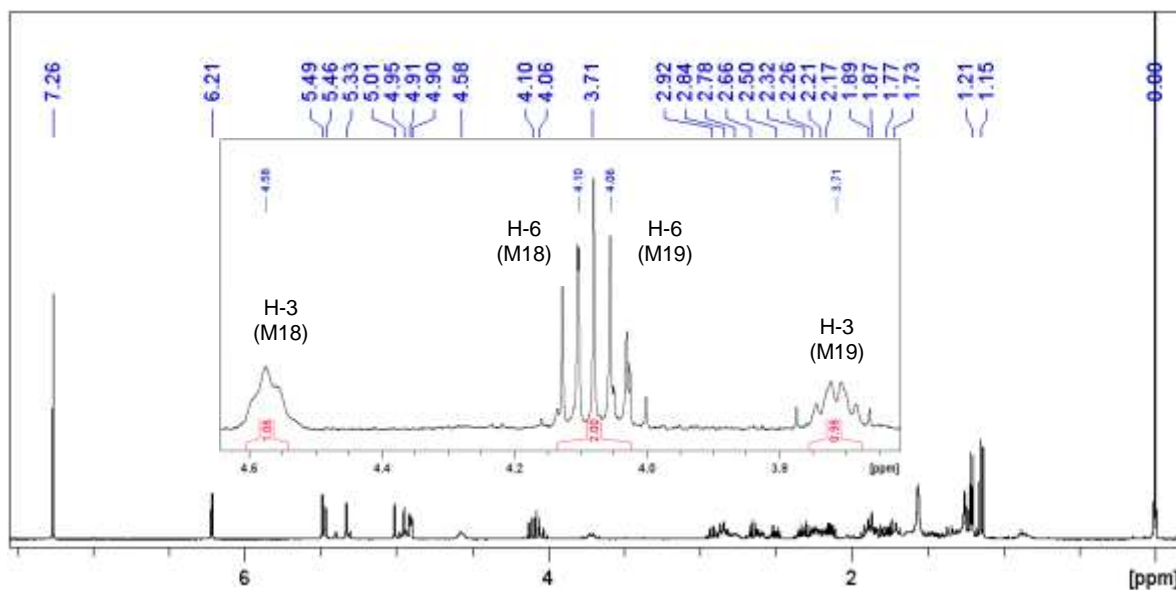


Figura 41– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **M18** e **M19**.

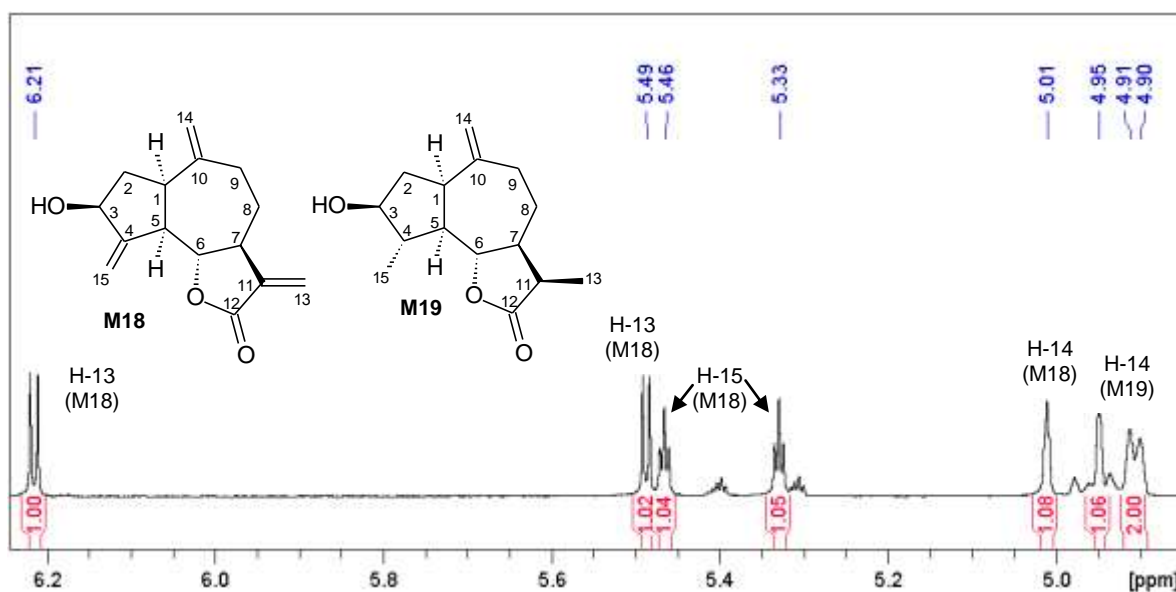


Figura 42 – Ampliação da região de hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **M18** e **M19**.

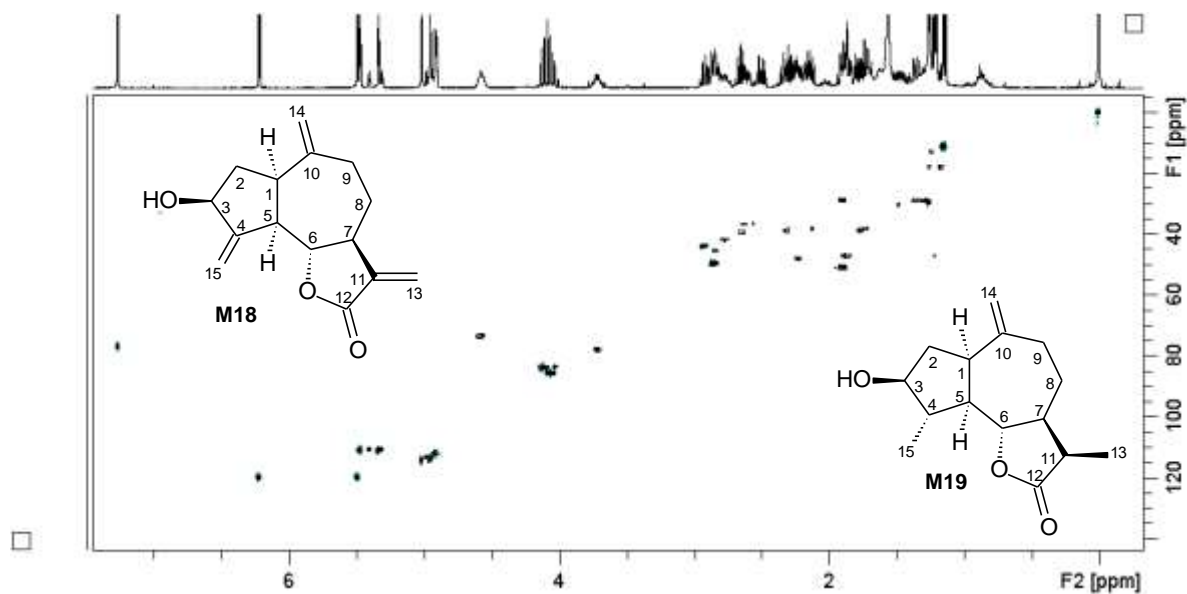


Figura 43 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19.

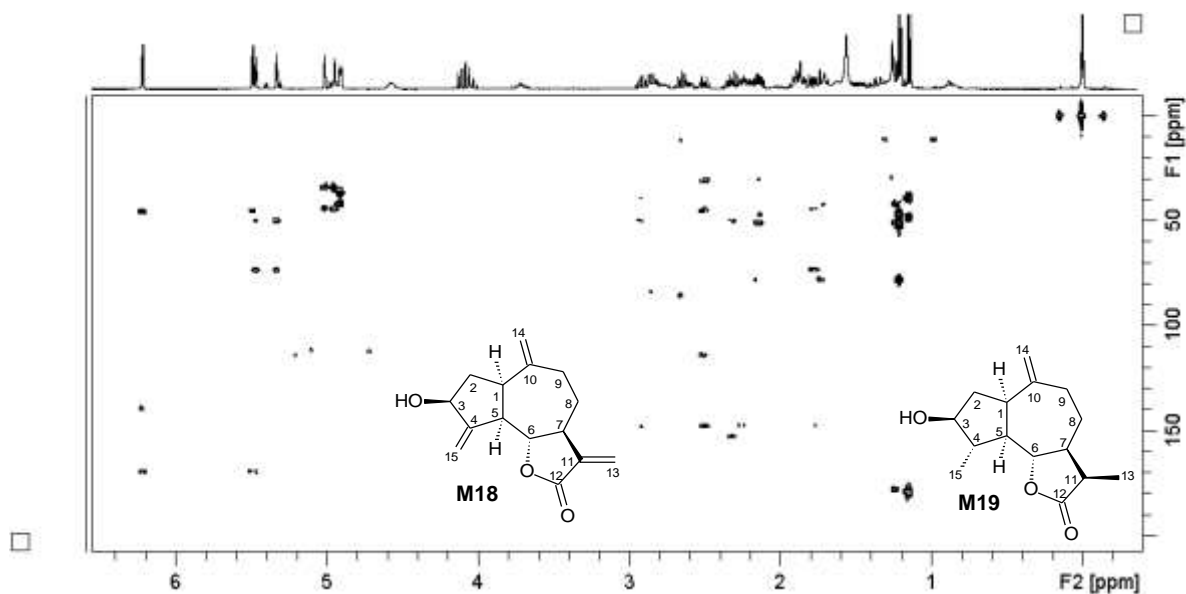
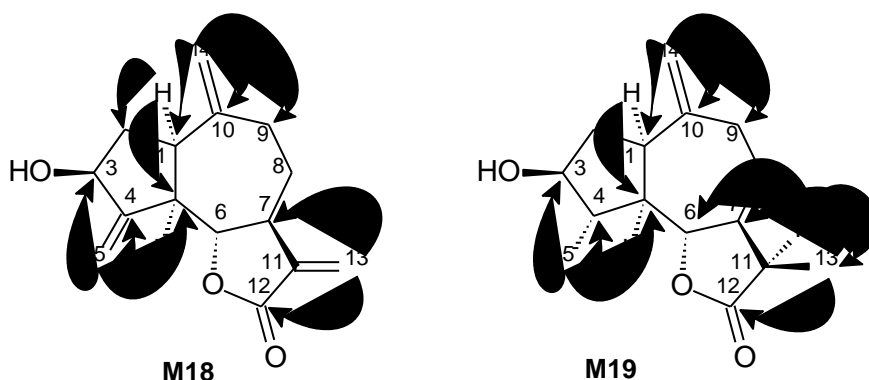


Figura 44 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) da mistura de M18 e M19.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, CDCl_3) para **M18** e **M19**.

Posição	M18			M19		
	δ_{H} (multiplicidade; J em Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	δ_{H} (multiplicidade; J em Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	2,92 (<i>m</i>)	44,0	2, 5, 6, 10, 14	2,78 (<i>m</i>)	41,9	5
2a	1,77 (<i>m</i>)	39,1	1, 3, 5, 10	1,73 (<i>m</i>)	38,5	n.o.
2b	2,32 (<i>m</i>)			2,35 (<i>m</i>)		
3	4,58 (<i>m</i>)	73,6	n.o.	3,71 (<i>m</i>)	78,3	n.o.
4	-	153,1	-	1,87 (<i>m</i>)	47,2	6
5	2,84 (<i>m</i>)	50,1	1, 4, 6	1,89 (<i>m</i>)	50,9	4, 6
6	4,10 (<i>dd</i> ; 8,9; 8,8)	83,8	4, 8	4,06 (<i>dd</i> ; 8,9; 8,8)	85,7	4
7	2,84 (<i>m</i>)	45,6	6	2,21 (<i>m</i>)	48,1	n.o.
8a	2,26 (<i>m</i>)	30,6	7, 10	n.d.	n.d.	n.d.
8b						
9a	2,50 (<i>m</i>)	34,2	1, 7, 8, 10, 14	1,80 (<i>m</i>)	36,7	n.o.
9b				2,60 (<i>m</i>)		
10	-	148,1	-	-	149,4	-
11	-	139,7	-	2,66 (<i>dq</i> ; 7,8; 7,9)	39,5	6, 12, 13
12	-	170,0	-	-	179,8	-
13	5,49 (<i>d</i> , 3,2) 6,21 (<i>d</i> , 3,2)	120,1	7, 11, 12	1,14 (<i>d</i> , 7,8)	11,0	7, 11, 12
14a	5,01 (<i>sf</i>)	114,2	1, 9, 10	4,91 (<i>sf</i>)	112,2	1, 9, 10
14b	4,95 (<i>sf</i>)			4,90 (<i>sf</i>)		
15	5,33 (<i>t</i> , 2,1) 5,46 (<i>t</i> , 2,1)	111,2	3, 4, 5	1,21 (<i>d</i> , 6,3)	13,1	3, 4, 5

n.d. – não definido devido a sobreposição de sinais; n.o. – não observado.

**Figura 45** – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância das substâncias **M18** e **M19**.

5.2.2 – Identificação das substâncias M25 e M26

As substâncias **M25** e **M26** foram isoladas como sólidos cristalinos incolores. Os seus espectros de RMN de ^1H foram muito semelhantes entre si, e também similares ao espectro de RMN de ^1H de **M18** e **M19**, mostrando tratar-se de substâncias com o mesmo esqueleto básico.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 50, p. 68) de **M25** apresentou sinais de quatro hidrogênios olefínicos na região entre δ 5,00-5,40, sinais de hidrogênios oximetínicos em δ 3,98 e 4,74, vários multipletos referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos sp^3 entre δ 1,68 e 2,88, além de um duplete em δ 1,15, característico de um grupo metila ligado a carbono saturado. Através dos mapas de correlação a uma ligação (Figura 52, p. 69) e a longa distância (Figuras 53 - 54, p. 69) foram observados tres carbonos oxigenados, sendo dois metínicos (δ 72,5, e 82,3) e um quaternário (δ 81,1), além de um grupo éster em δ 179,3. A análise das demais correlações (Tabela 12, p. 70) levou à estrutura de um guaianolídeo hidroxilado em C-1 e C-3 (Figura 46, p. 66). Esta substância é inédita na literatura.

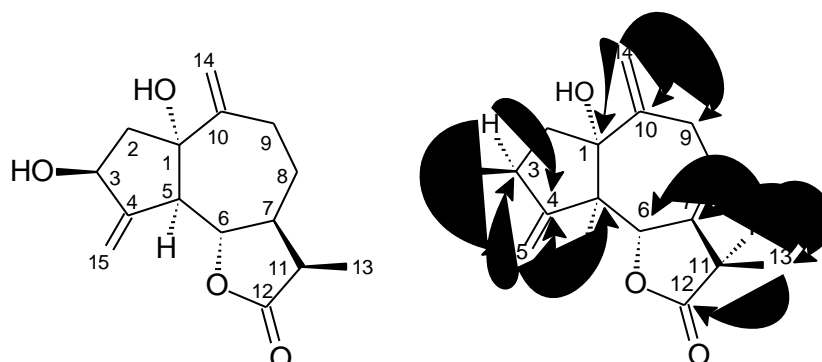


Figura 46 – Estrutura e principais correlações mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **M25** (1 α -hidroxi-11 α ,13-diidrozaluzanin C).

A configuração relativa em C-3, C-5, C-6, C-7 e C-11 foi deduzida dos dados de RMN, que foram similares aos de **M18**, mas a orientação da hidroxila em C-1 permaneceu incerta. Para elucidar essa parte da estrutura, foi obtido um monocristal de **M25**, que foi analisado por cristalografia de Raios-X. A qualidade do cristal permitiu não só deduzir que a junção dos anéis em C-1 e C-5 era *cis*, como também determinar a configuração absoluta de **M25** como 1*S*, 3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*S*, 11*R* (Figura 47, p. 67). Também foi registrada a curva de dicroísmo circular (Figura 48, p. 67) que se mostrou típica de diidroguaianolídeos (ZHANG *et al.*, 2014).

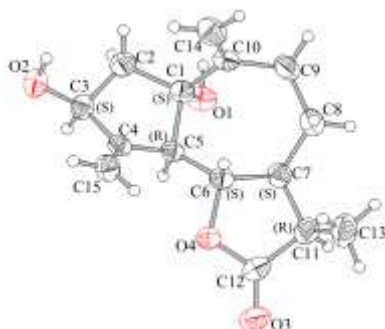


Figura 47 – Ilustração da configuração absoluta de **M25**, obtida através de Cristalografia de Raios-X.

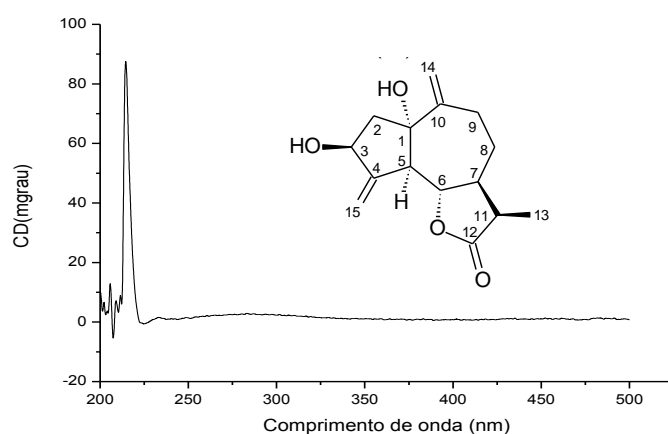


Figura 48 – Dicroísmo circular de **M25**.

Para complementar os dados espectrométricos de **M25**, foi obtido o espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 49, p. 67), que apresentou um pico em m/z 263,1329 ($[M-1]^-$), confirmando a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$.

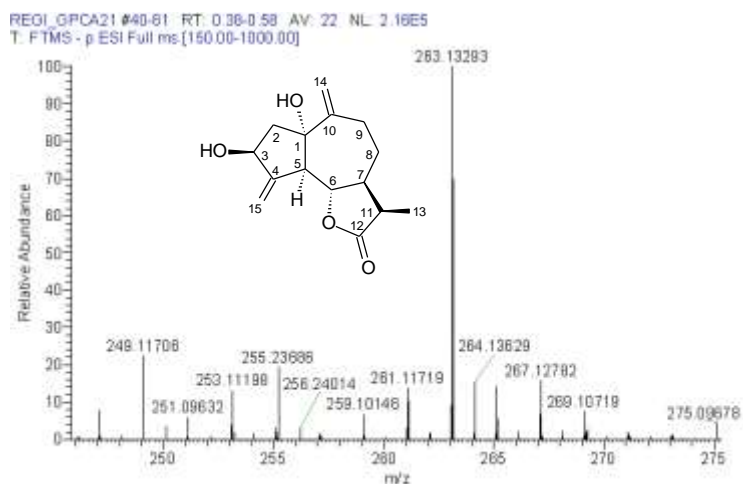


Figura 49 – Espectro de massas de alta resolução, no modo negativo, de **M25**.

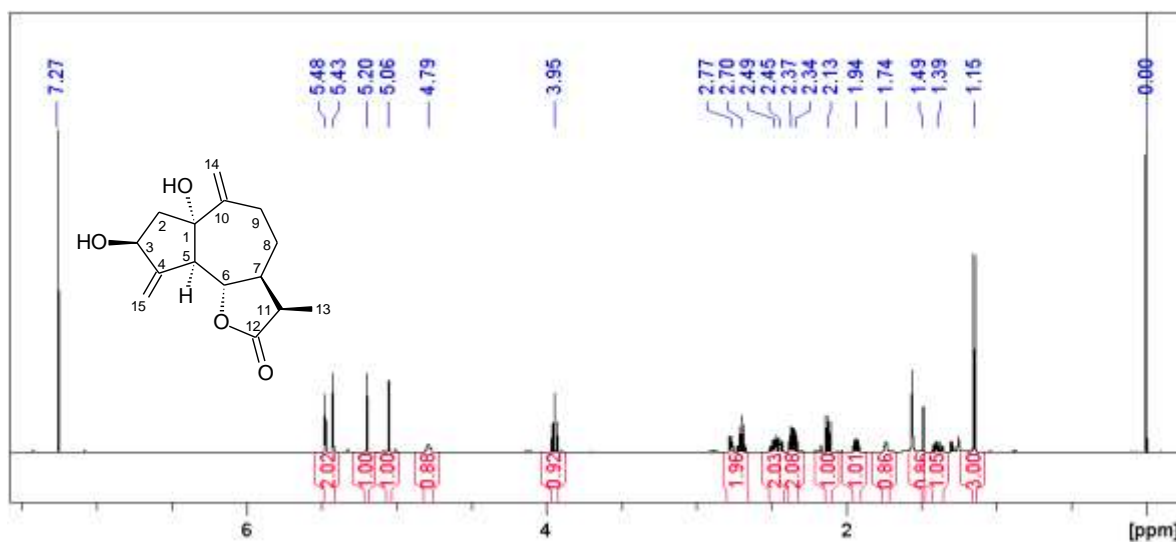


Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de **M25**.

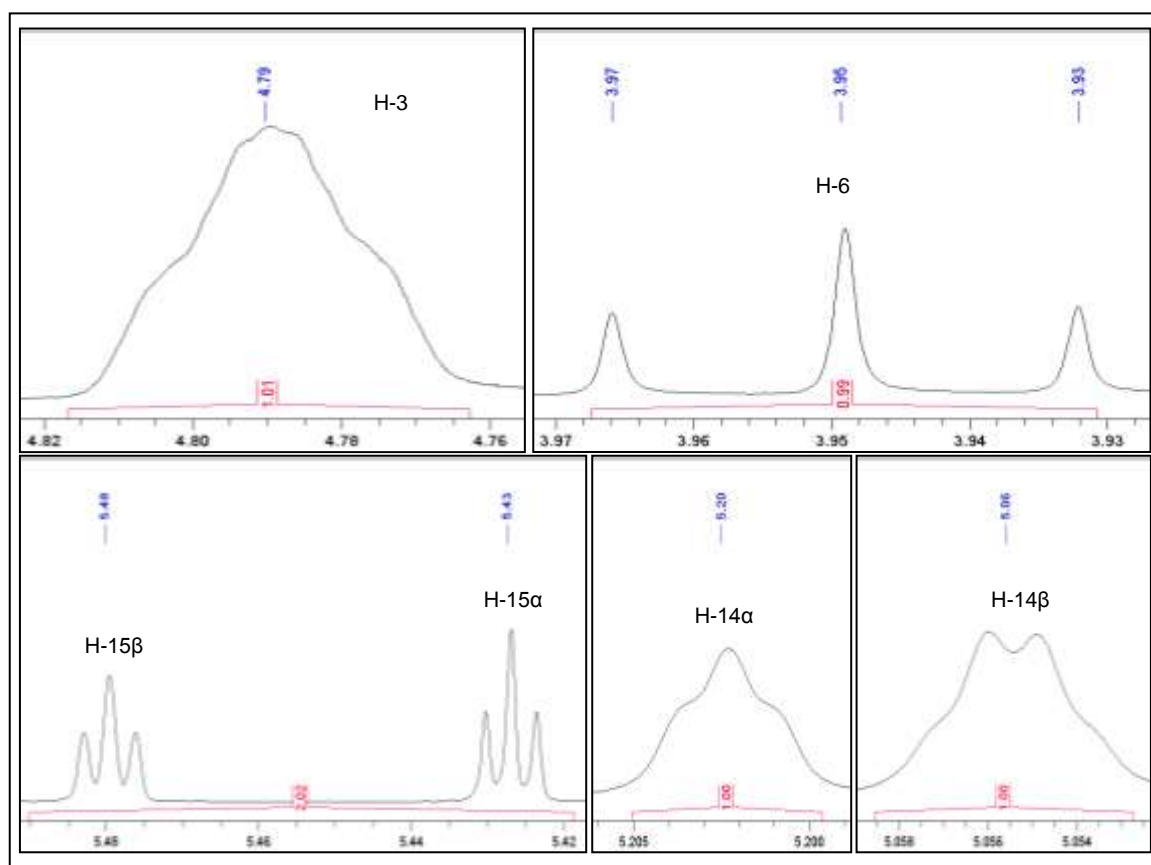


Figura 51 – Ampliações das regiões de hidrogênios olefínicos e carbinólicos do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de **M25**.

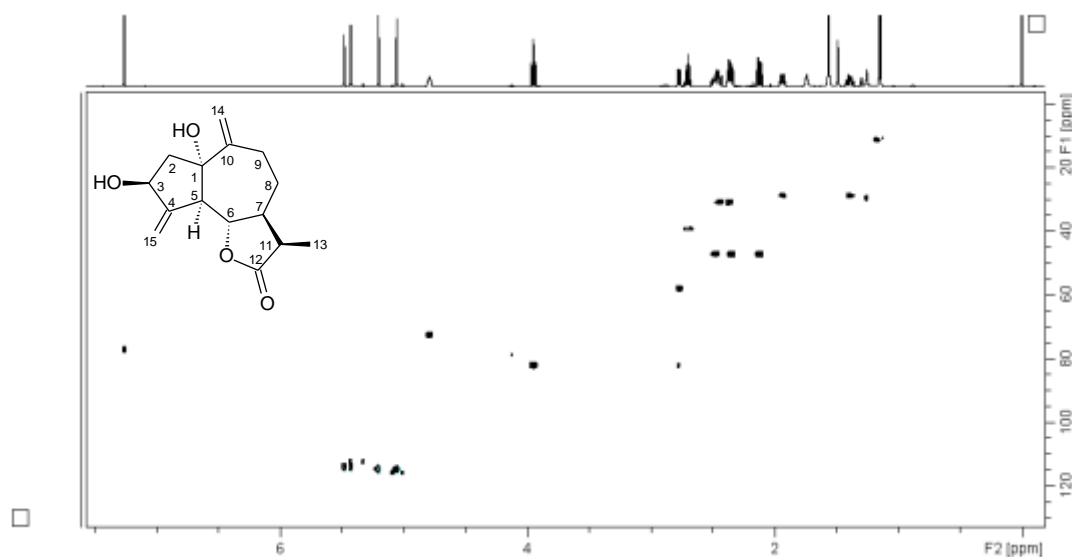


Figura 52 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CDCl_3) de **M25**.

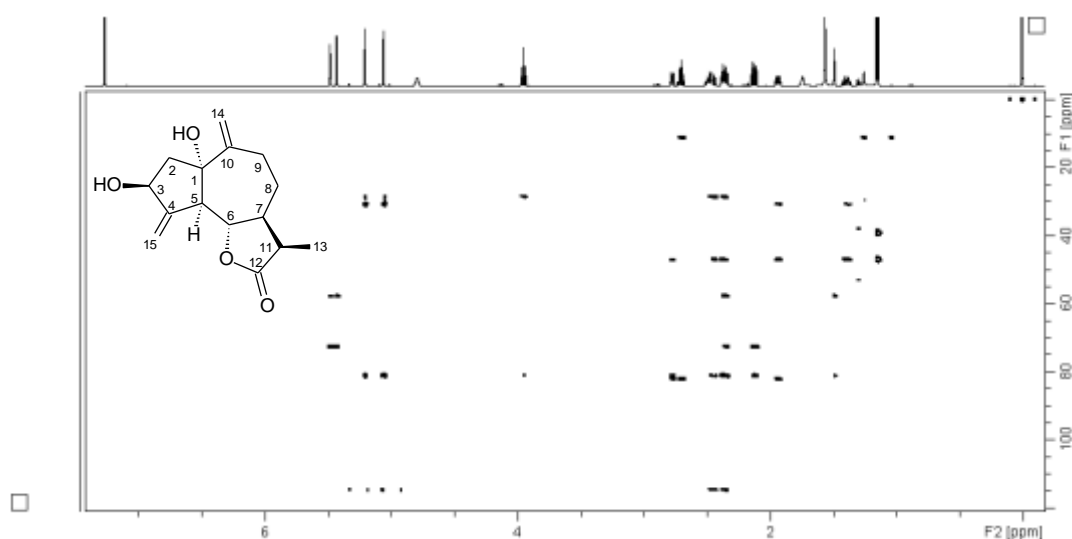


Figura 53 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) de **M25**.

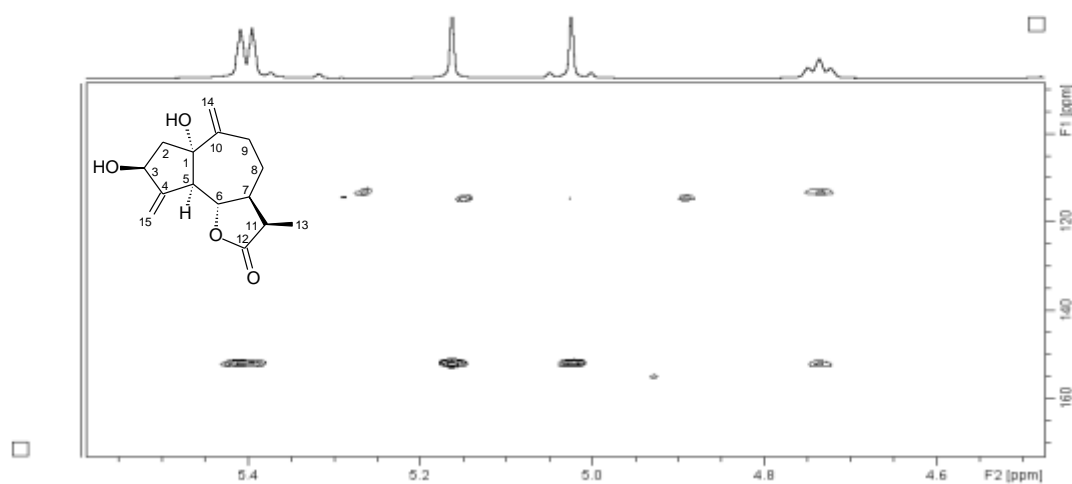


Figura 54 – Ampliação da região olefínica do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CDCl_3) de **M25**.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (600 MHz, CDCl_3) para **M25**.

Posição	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	-	81,1	-
2 α	2,13 (<i>dd</i> , 13,8; 8,0)	47,3	1, 3, 5, 10
2 β	2,34 (<i>ddd</i> , 13,8; 7,4; 1,5)		
3	4,79 (<i>dddd</i> , 8,0; 7,4; 5,4; 2,1; 1,9)	72,5	4, 15
4	-	151,7	-
5	2,77 (<i>dddd</i> , 10,2; 1,9; 1,9; 1,5)	58,0	1, 3, 4, 5, 6, 11
6	3,95 (<i>dd</i> , 10,2; 10,1)	82,3	1, 4, 5, 8, 11
7	2,49 (<i>dddd</i> , 12,6; 10,1; 7,9; 4,1)	47,2	6, 8, 9, 13
8 α	1,94 (<i>dddd</i> , 13,1; 5,1; 4,1; 3,8)	28,8	6, 7, 9, 10
8 β	1,39 (<i>dddd</i> , 13,1; 12,6; 11,5; 3,9)		
9 α	2,37 (<i>dddd</i> , 13,1; 5,1; 3,8; 0,7)	30,9	1, 5, 7
9 β	2,45 (<i>dddd</i> , 13,1; 11,5; 3,9; 0,8; 0,7)		
10	-	151,6	-
11	2,70 (<i>dq</i> , 7,9; 7,8)	39,3	6, 12, 13
12	-	179,3	-
13	1,15 (<i>d</i> , 7,8)	11,3	7, 9, 12
14 α	5,20 (<i>dd</i> , 0,9; 0,7)	114,8	1, 8, 9, 10
14 β	5,06 (<i>ddd</i> , 0,9; 0,8; 0,7)		
15 α	5,43 (<i>dd</i> , 2,0; 1,9)	113,9	3, 4, 5, 6
15 β	5,48 (<i>t</i> , 2,1; 2,0)		
OH-1	1,49 (<i>s</i>)	-	-
OH-3	1,74 (<i>d</i> , 5,4)	-	-

O espectro de RMN de ^1H de **M26** (Figura 56, p. 71) mostrou o mesmo padrão de sinais observado para o correspondente espectro de **M25**, diferindo principalmente pela presença de um sinal adicional de um hidrogênio oximetínico (δ 3,70; *m*). No mapa de correlação a uma ligação (Figura 57 p. 72) os três hidrogênios oximetínicos em δ 3,70; 4,14 e 4,47 mostraram correlações com os carbonos em δ 69,6; 79,2 e 73,3. O segundo sinal é característico da posição 6 nos guaianolídeos. No mapa de correlação a longa distância (Figura 58, p. 72), foi observado que o hidrogênio em δ 3,70 mostrava correlações com os carbonos em δ 143,2 e 38,6, enquanto que H-6 mostrava correlação com o carbono em δ 69,6 e, o hidrogênio em δ 4,47 mostrava correlações com os carbonos em δ 112,3 (C-15) e 152,4 (C-4). Portanto, **M26** deve ser hidroxilado em C-3 e C-8. Através de análise das demais correlações (Tabela 13, p. 73; Figura 59, p. 73) e

comparação com a literatura, **M26** foi identificada como 8 α -hidroxi-11 α ,13-diidrozaluzanin C (Figura 55, p. 71), uma lactona conhecida previamente isolada de *Ainsliaea fragrans* (Li *et al.*, 2008).

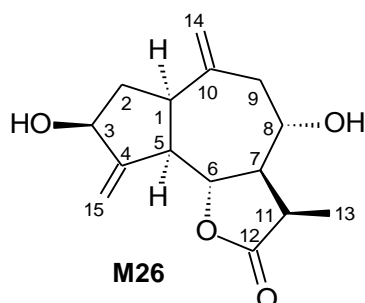


Figura 55 – Estrutura de **M26** (8 α -hidroxi-11 α ,13-diidrozaluzanin C).

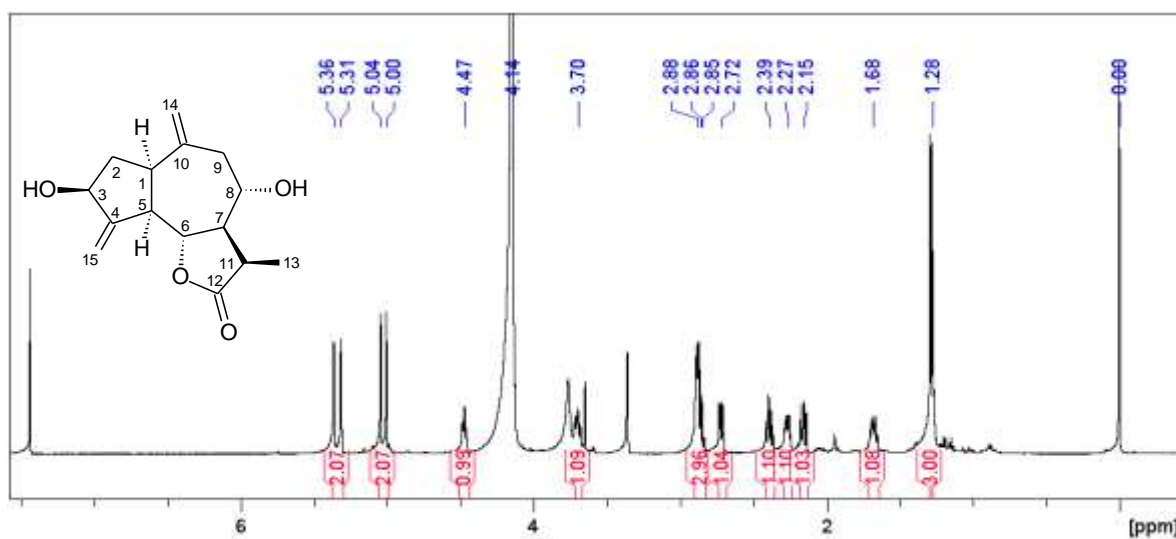


Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **M26**.

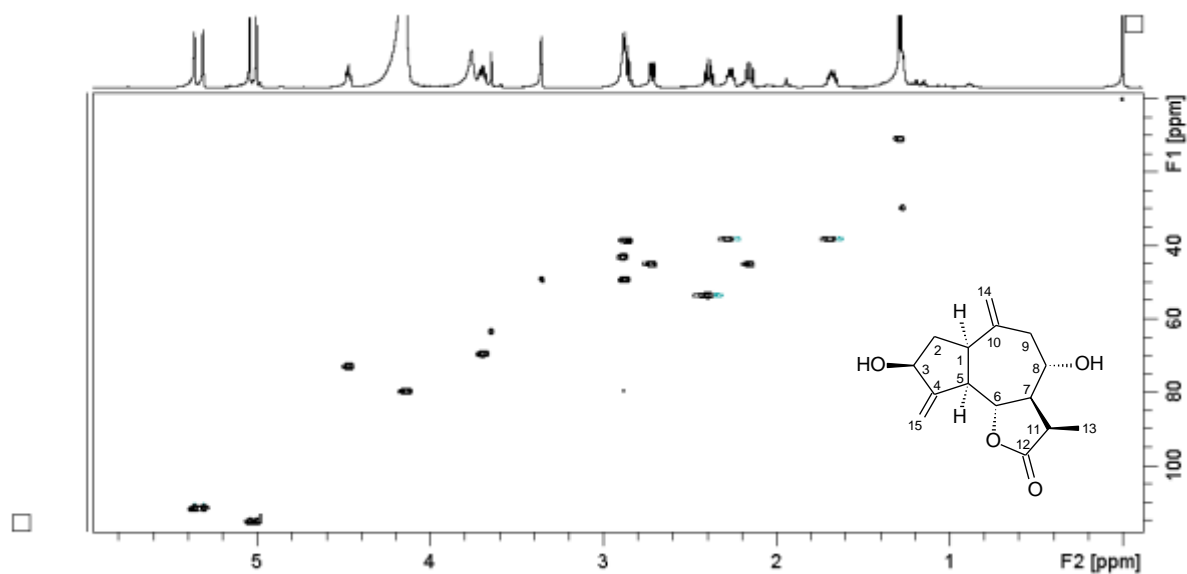


Figura 57 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **M26**.

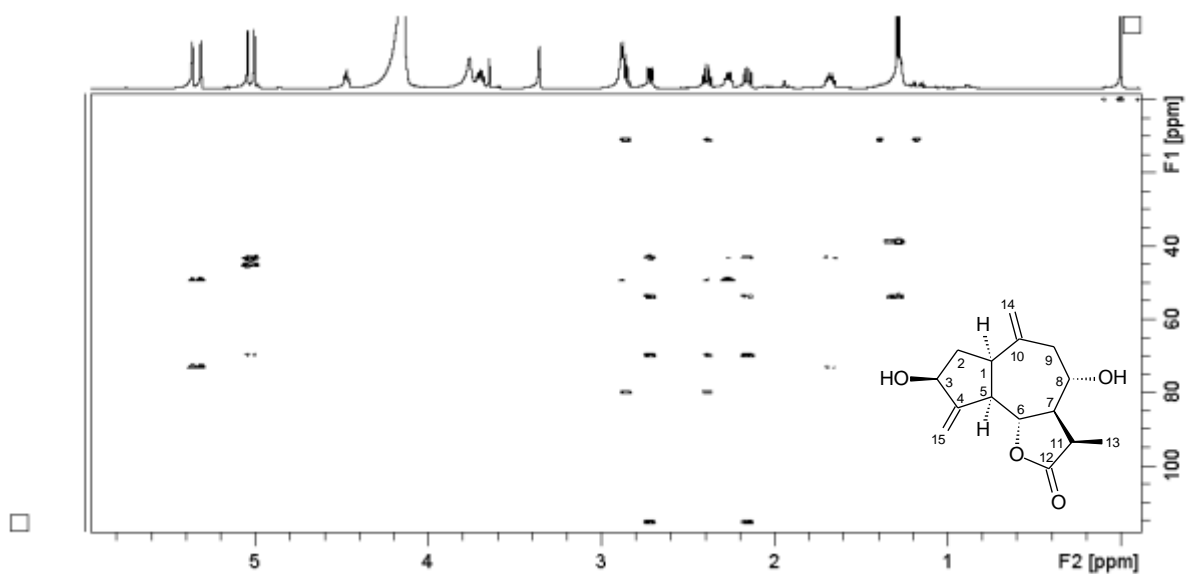


Figura 58 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **M26**.

Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) para **M26**.

Posição	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	2,89 (<i>m</i>)	43,2	5,10,14
2 α	1,68 (<i>m</i>)	38,2	1, 3, 5, 10
2 β	2,27 (<i>m</i>)		
3	4,47 (<i>dd</i> , 7,5; 7,5)	73,3	4, 15
4	-	152,4	-
5	2,88 (<i>m</i>)	49,4	1, 4, 7
6	4,14 (<i>dd</i> , 10,0; 9,9)	79,2	1, 5, 8
7	2,36 (<i>m</i>)	53,5	5, 6, 8, 9, 11,13
8 α	3,70 (<i>m</i>)	69,6	7, 10, 11
8 β			
9 α	2,15 (<i>m</i>)	44,8	1, 7, 8, 10, 14
9 β	2,72 (<i>m</i>)		
10	-	143,2	-
11	2,86 (<i>dq</i> , 8,0; 7,8)	38,7	6, 7, 2, 13
12	-	180,1	-
13	1,28 (<i>d</i> , 7,6)	11,1	7, 11, 12
14 α	5,00 (<i>s</i>)	115,6	1, 8, 9, 10
14 β	5,04 (<i>s</i>)		
15 α	5,32 (<i>d</i> , 2,0)	112,3	3, 4, 5
15 β	5,37 (<i>d</i> , 2,0)		

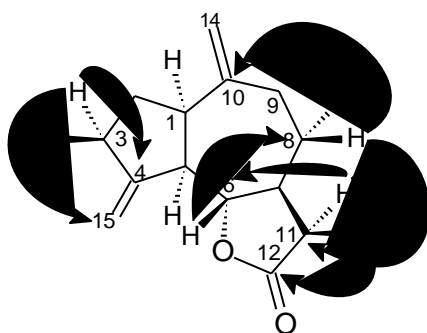


Figura 59 – Principais correlações observadas no mapa de mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **M26**.

5.2.3 – Identificação da substância M27

A substância **M27** foi isolada como um sólido amarelado. O seu espectro de RMN de ^1H (Figura 61, p. 74) foi muito semelhante ao de **M25** (Figura 50, p. 68), diferindo principalmente pela presença de vários multipletos de hidrogênios oximetínicos entre δ 3,3 - 4,2. Através do mapa de correlação a uma ligação (Figura 62, p. 75) esses hidrogênios foram associados aos seus respectivos carbonos, observando-se a presença de sete carbonos oximetínicos e um oximetilênico. Entre eles, um duplete em δ 4,49 ($J = 7,9$) estava associado a um carbono em δ 100,9, o que é característico do hidrogênio anomérico da β -D-glucose. Portanto **M27** deve ser uma lactona glicosilada. O mapa de correlação a longa distância (Figura 63, p. 75), mostrou que o hidrogênio em δ 4,56 fazia correlações com os carbonos em δ 50,2, 100,9 e 114,1. Comparando essas informações com os dados dos demais guaianolídeos já isolados, foi possível localizar a unidade glucose em C-3. Analisando-se as demais informações obtidas a partir dos diferentes espectros (Tabela 14, p. 76), **M27** foi identificada como 11 α ,13-diidroglucozaluzanin C, uma lactona conhecida previamente isolada de *Ainsliaea fragrans* (LI *et al.*, 2008).

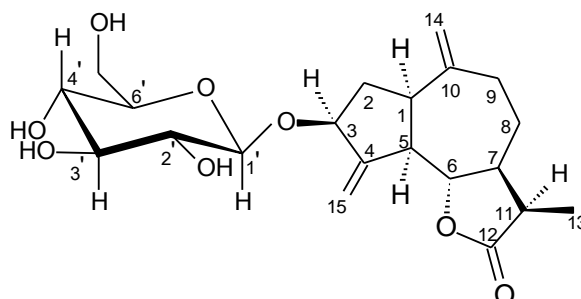


Figura 60 – Estrutura da substância **M27** (11 α ,13-diidroglucozaluzanin C).

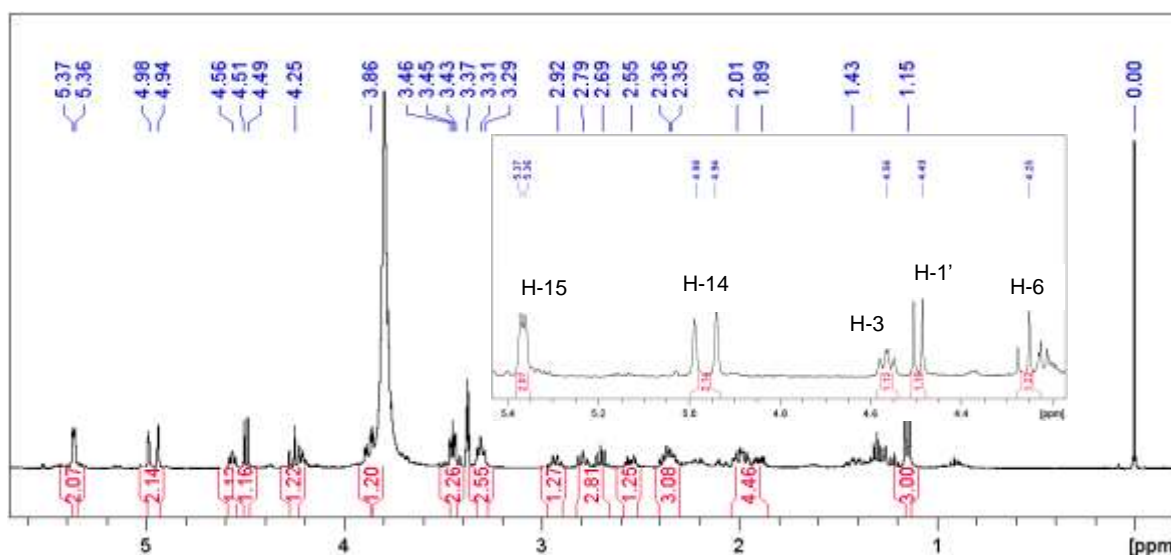


Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de **M27**.

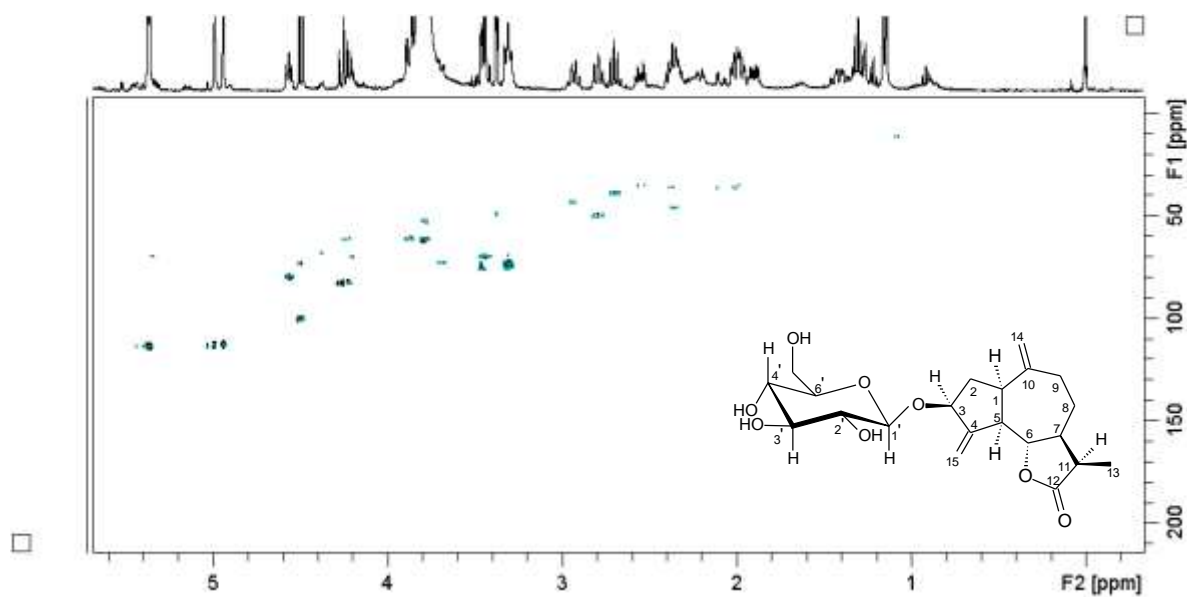


Figura 62 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de M27.

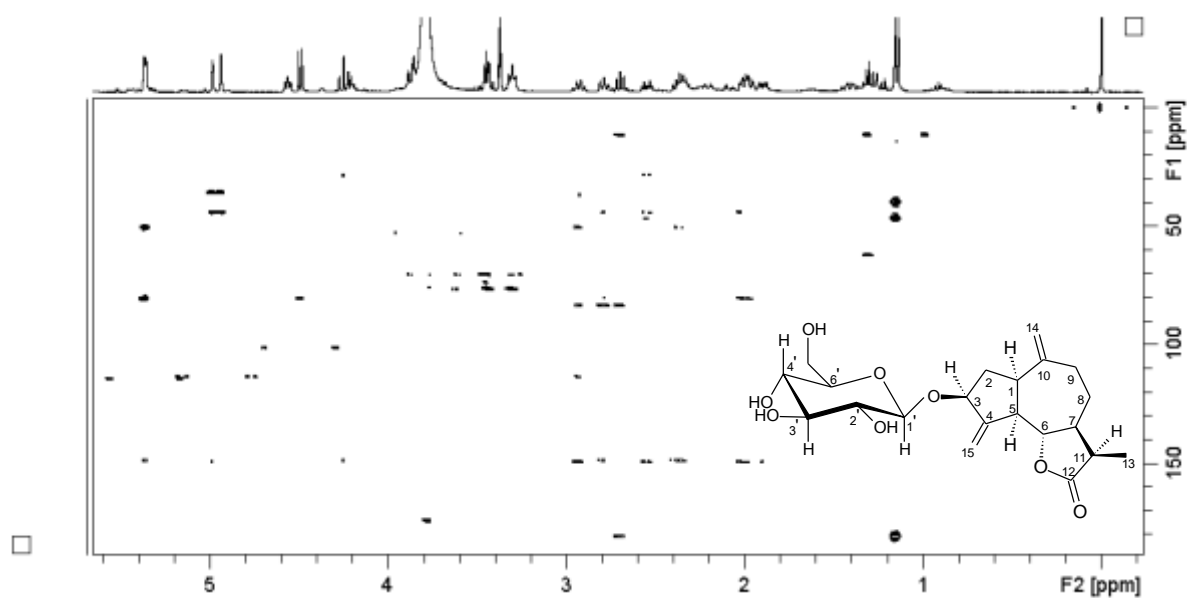
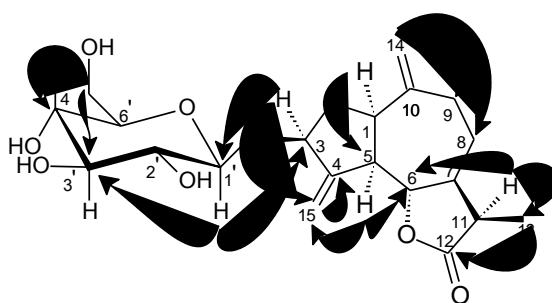


Figura 63 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de M27.

Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) para **M27**.

Posição	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	2,92 (<i>m</i>)	43,9	3, 5, 10
2 α	2,36 (<i>m</i>)	36,7	4, 5, 10
2 β	1,98 (<i>m</i>)		
3	4,56 (<i>dddd</i> , 8,4; 6,9; 1,3; 1,1)	80,2	1, 5, 15, 1'
4	-	149,2	-
5	2,79 (<i>ddd</i> , 10,1; 1,5; 1,5)	50,2	1, 3, 6, 10, 15
6	4,25 (<i>dd</i> , 10,1; 10,0)	83,4	1, 4, 8
7	2,35 (<i>m</i>)	46,5	6, 11, 12,13
8 α	1,43 (<i>m</i>)	28,3	10, 11
8 β	1,89 (<i>m</i>)		
9 α	2,01 (<i>m</i>)	35,5	1, 8, 10, 14
9 β	2,55 (<i>m</i>)		
10	-	148,7	-
11	2,69 (<i>dq</i> , 7,9; 7,8)	39,3	6, 11,12, 13
12	-	180,8	-
13	1,15 (<i>d</i> , 7,8)	11,0	7, 11, 12
14 α	4,98 (<i>s</i>)	113,3	1, 8, 9
14 β	4,94 (<i>s</i>)		
15 α	5,37 (<i>dd</i> , 1,6; 0,9)	114,1	3, 4, 5
15 β	5,36 (<i>dd</i> , 1,6; 1,2)		
Glc			
1'	4,49 (<i>d</i> , 7,8)	100,9	3, 3'
2'	3,48 (<i>m</i>)	76,1	n.d.
3'	3,37 (<i>m</i>)	75,7	n.d.
4'	3,43 (<i>m</i>)	70,2	n.d.
5'	3,29 (<i>m</i>)	76,3	n.d.
6'a	3,86 (<i>dd</i> , 12,0; 3,5)	61,4	3', 4'
6'b	3,77 (<i>d</i> , 12,0)		3', 4'

n.d. – não definido devido a sobreposição de sinais.

**Figura 64** – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **M27**.

5.2.4 – Identificação da substância M21

A substância **M21** foi isolada como um sólido branco. O seu espectro de RMN de ^1H (Figuras 67-68, p. 78) foi característico de um guaianolídeo dimérico, e muito similar ao de **M22** (Figura 66, p. 78), previamente isolado dessa planta, mostrando apenas pequenas diferenças nos deslocamentos químicos em algumas regiões, em particular, nas regiões carbinólicas e olefínicas (Tabela 15, p. 81), que apresentam grupos de sinais bem definidos entre δ 6,3 e 3,7. A principal diferença entre estas duas substâncias fica evidenciada para o hidrogênio oximetínico da posição 6, sugerindo alguma diferença na estereoquímica em relação a **M22** (STRAPASSON, 2010).

Através de análise dos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 15, p. 80; Figuras 66 - 70, p. 78 – 79) e comparação com dados publicados (XIA *et al.*, 2013), **M21** foi identificado como gochnatiolido B, um estereoisômero de gochnatiolido A (**M22**), diferindo pela estereoquímica da hidroxila em C-10. Como ilustração, está apresentada a sobreposição dos espectros de RMN ^1H de **M21** e **M22** (Figura 66, p. 78).

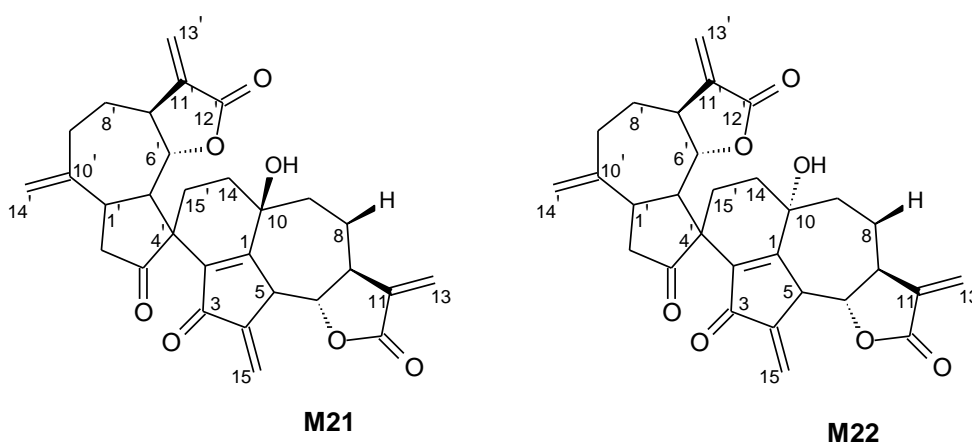


Figura 65 – Estruturas de **M21** (gochnatiolido B) e **M22** (gochnatiolido A).

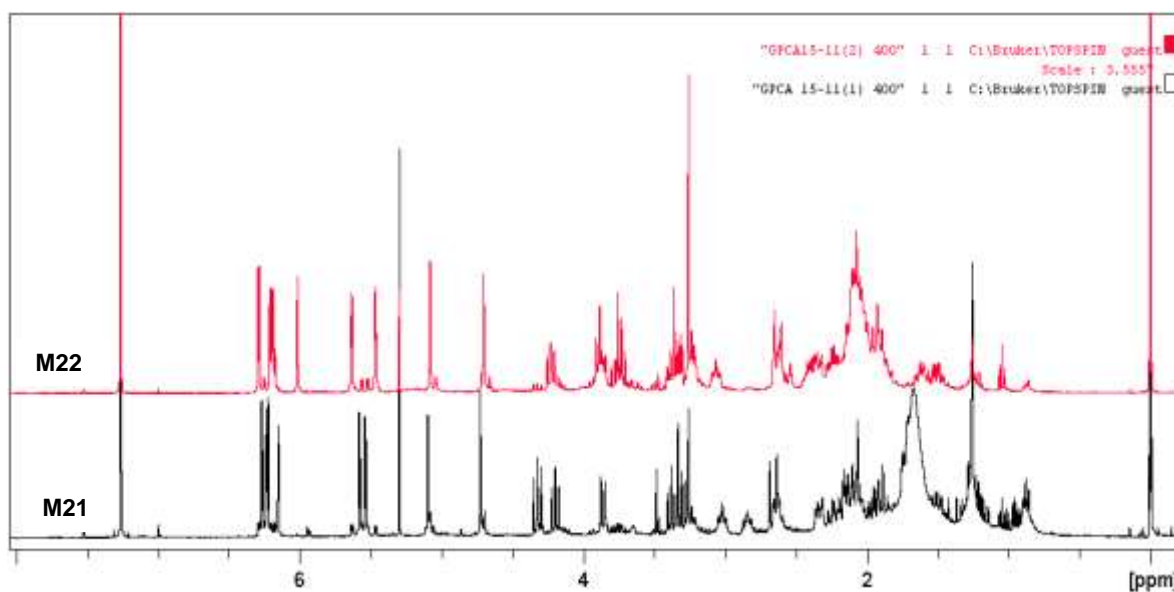


Figura 66 – Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M21** e **M22**.

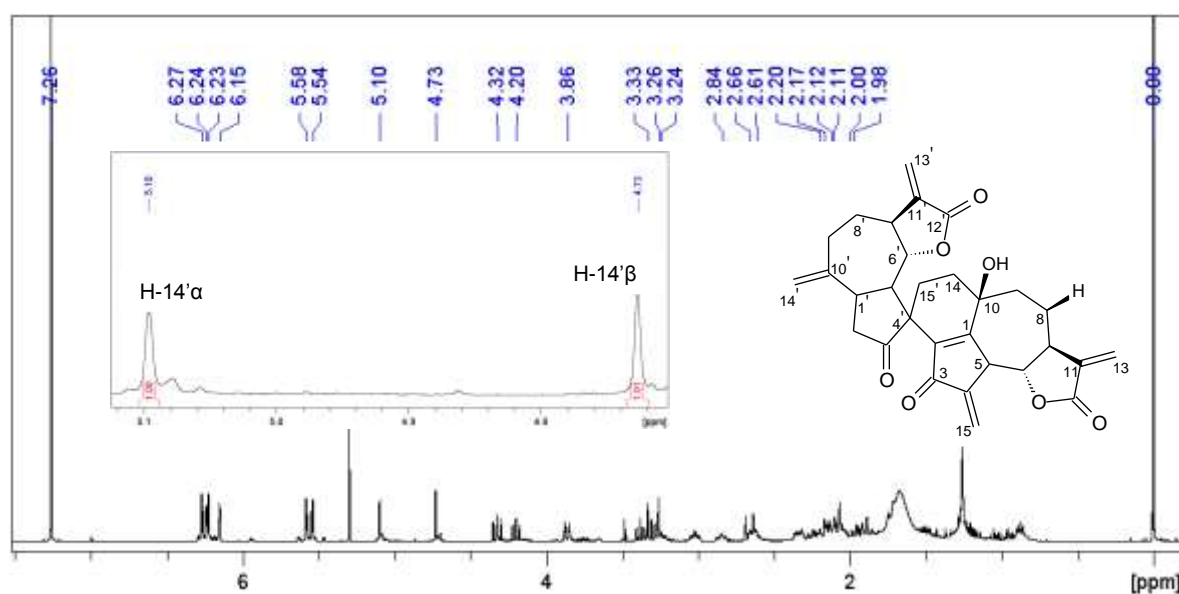


Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M21**.

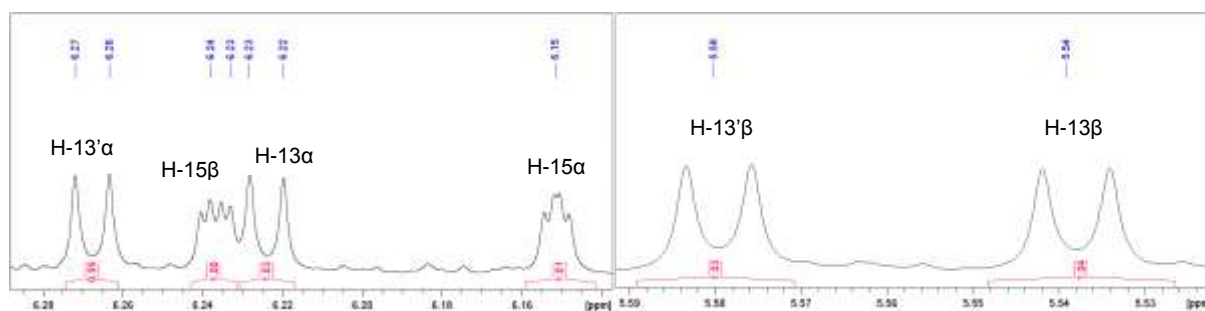


Figura 68 – Ampliações da região olefínica do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M21**.

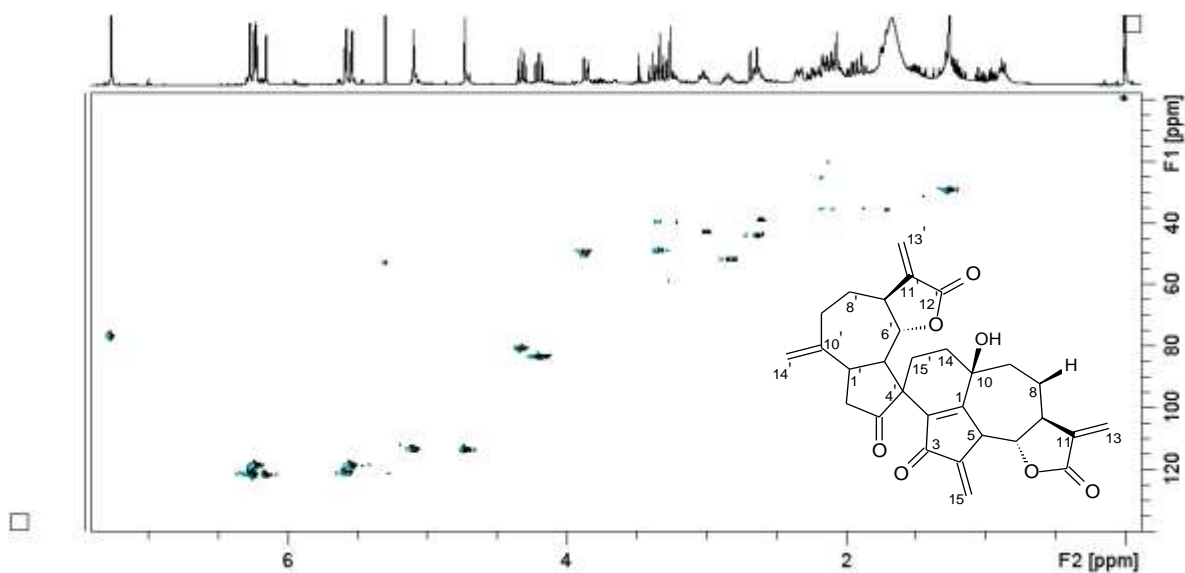


Figura 69 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) de **M21**.

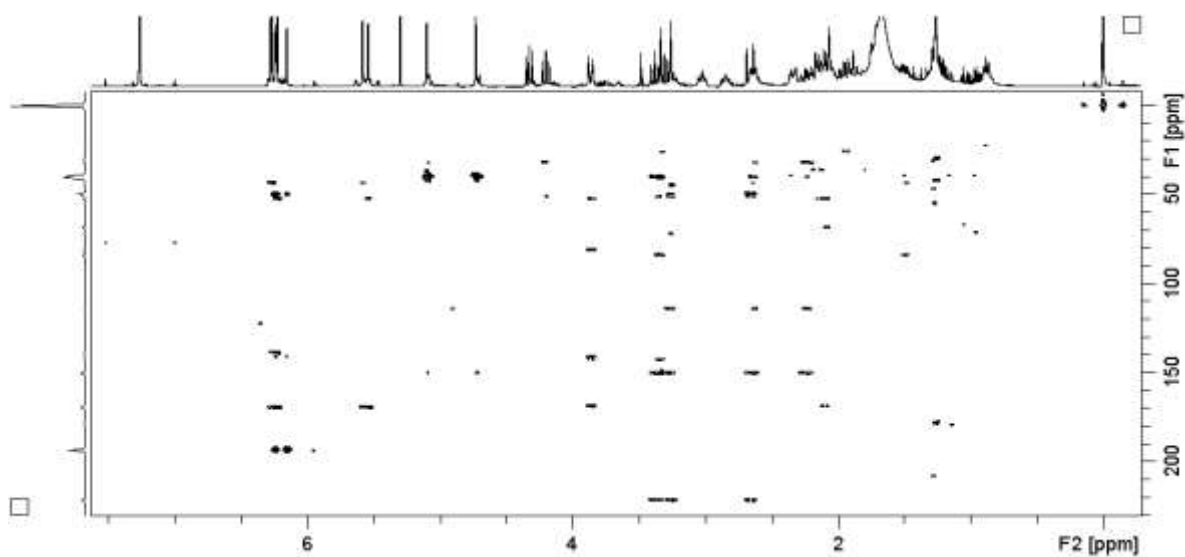


Figura 70 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) de **M21**.

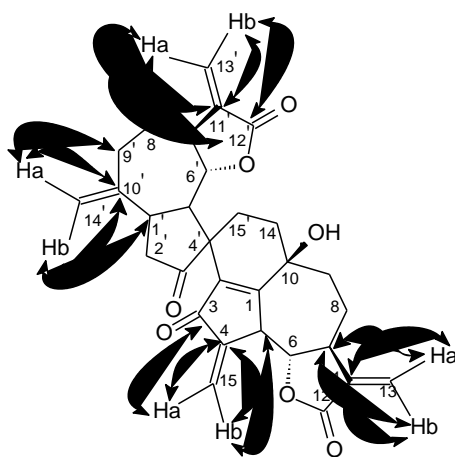


Figura 71 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) de **M21**.

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, CDCl_3) para **M21** e **M22**.

Posição	M21			M22	
	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}
1	-	168,9		-	170,6
2	-	142,4		-	143,2
3	-	193,5		-	194,1
4	-	140,9		-	142,0
5	3,86 (ddd, 10,8; 1,5; 1,0)	49,7	1, 4, 6, 7	3,88 (ddd, 10,8; 1,5; 1,0)	47,3
6	4,32 (dd, 10,8; 9,7)	81,3	5, 7	3,74 (dd, 10,8; 9,7)	83,6
7	2,84 (m)	52,4	5, 6, 8, 11	2,84 (m)	43,4
8a	2,17 (m)	25,8	7, 9, 10, 11	2,17 (m)	35,3
8b	2,00 (m)			2,00 (m)	
9a	2,12 (m)	20,8	7, 8, 10	2,12 (m)	38,4
9b	1,98 (m)			1,98 (m)	
10	-	68,3		-	71,1
11	-	138,9		-	140,3
12	-	169,6		-	169,9
13 α	6,22 (d, 3,4)	119,5	7, 11, 12	6,20 (d, 3,5)	119,6
13 β	5,54 (d, 3,4)			5,48 (d, 3,3)	
14a	2,11 (m)	26,4	10, 15'	2,11 (m)	28,3
14b					
15a	6,15 (dd, 1,5; 1,0)	122,7	3, 4, 5	6,02 (dd, 1,0; 1,0)	122,5
15b	6,23 (dd, 2,0; 1,0)			6,22 (dd, 1,0; 1,0)	
1'	3,34 (m)	40,2	3', 6', 10'	3,34 (m)	39,9
2'a	2,65 (m)	45,0	3', 5', 10'	2,65 (m)	44,9
2'b					
3'	-	221,5		-	219,7
4'	-	50,8		-	51,0
5'	3,24 (m)	49,3	2', 3', 6', 10'	3,24 (m)	49,1
6'	4,20 (dd, 9,8; 9,2)	84,2	1', 11', 12'	4,22 (dd, 10,2; 9,0)	84,4
7'	3,05 (m)	43,5	9', 12', 13'	3,05 (m)	43,5
8'a	2,17 (m)	36,3	6', 10'	2,17 (m)	31,9
8'b	1,86 (m)			1,86 (m)	
9' α	2,62 (m)	39,4	1', 7'	2,62 (m)	39,4
9' β	2,20 (m)			2,20 (m)	
10'	-	150,2		-	150,1
11'	-	138,5		-	138,1
12'	-	169,4		-	170,4
13' α	6,27 (d, 3,4)	121,9	11', 7', 11', 12'	6,28 (d, 3,4)	121,8
13' β	5,58 (d, 3,4)			5,63 (d, 3,1)	
14' α	5,10 (s)	114,3	1', 2', 9', 10'	5,08 (s)	114,1
14' β	4,70 (s)			4,70 (s)	
15'a	2,66 (m)	27,8	2, 4', 10	2,66 (m)	23,0
15'b					

5.2.5 – Identificação da substância M20

A substância **M20** foi isolada como um sólido cristalino incolor. Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 73, p. 83) mostrou a presença de dois dupletos em δ 6,96 (8,0 Hz; 1H) e δ 6,84 (8,1 Hz; 1H), e um singlete largo em δ 7,05 (1H). Este conjunto de sinais evidenciou a existência de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Em adição, este espectro mostrou dois dupletos em δ 7,56 (d ; 15,9 Hz; 1H), δ 6,24 (d ; 15,9 Hz; 1H), característicos de hidrogênios olefínicos de uma ligação dupla com configuração *trans* e conjugada à carbonila (H-7 e H-8). Na região de hidrogênios alifáticos, mostrou um quarteto desprotegido em δ 4,25 (7,1 Hz; 2H), referente a hidrogênios oximetilênicos (C-1') e um triplete em δ 1,33 (7,1 Hz; 3H), referente a metila (C-2') (Figura 74, p. 83).

Através da análise dos mapas de correlação HSQC (Figura 75, p. 83) e HMBC (Figura 76, p. 84) de **M20** (Tabela 16, p. 84; Figura 77, p. 84) e comparação com os dados da literatura (XIANG *et al.*, 2007) foi possível confirmar a presença do sistema aromático 1,3,4-trissubstituído através dos sinais em δ 114,5; 115,6; 122,5; 127,6; 143,9 e 146,4. A presença de um grupo carbonila α,β -insaturado pode ser confirmado pelos sinais em δ 167,8; 144,9 e 115,9; correspondentes a um grupo carbonila (C-9) e aos dois carbonos metínicos sp^2 (C-7 e C-8). Finalmente, pode-se constatar a presença de um grupo etila pelos sinais em δ 60,6 e 14,4. Esses dados indicaram tratar-se do cafeato de etila (**M20**), uma substância inédita no gênero *Moquiniastrum*, mas que já foi isolada de outra Asteraceae, *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS. (BUSKÜHL, 2007). Esta substância apresenta elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória (CHALAS *et al.*, 2001; CHIANG *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

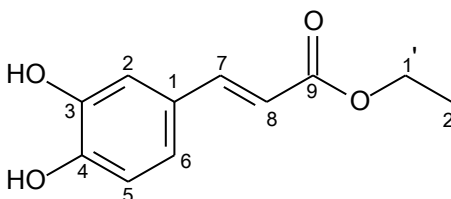


Figura 72 – Estrutura de **M20** (cafeato de etila).

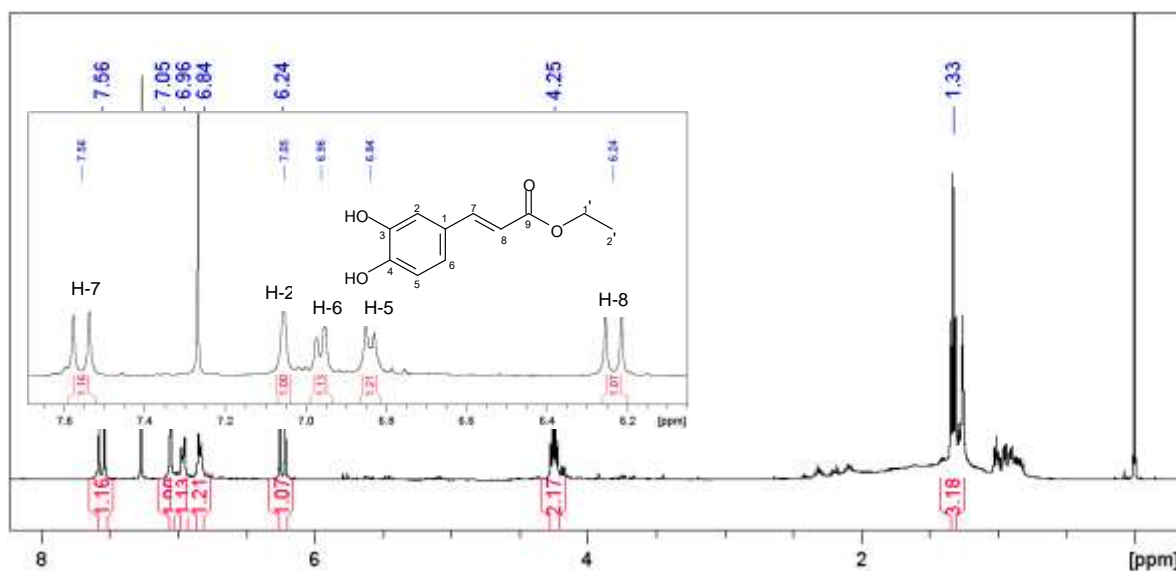


Figura 73 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M20**.

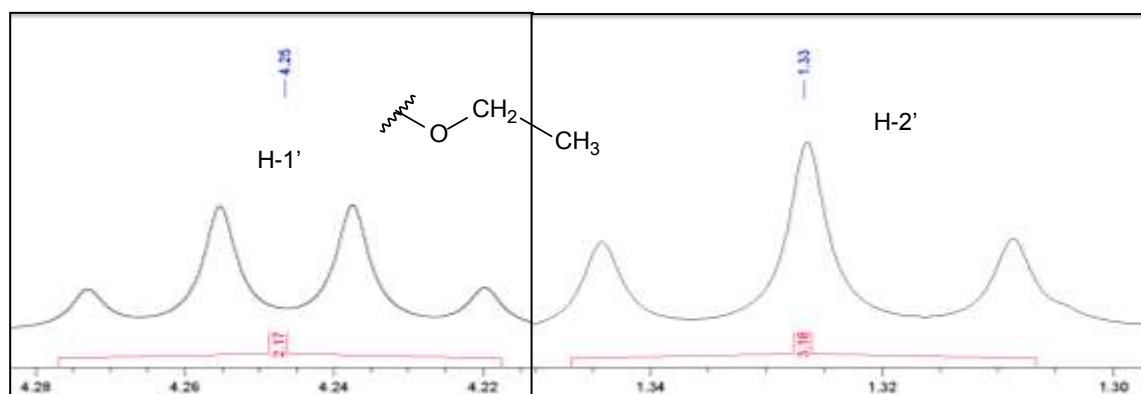


Figura 74 – Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M20**.

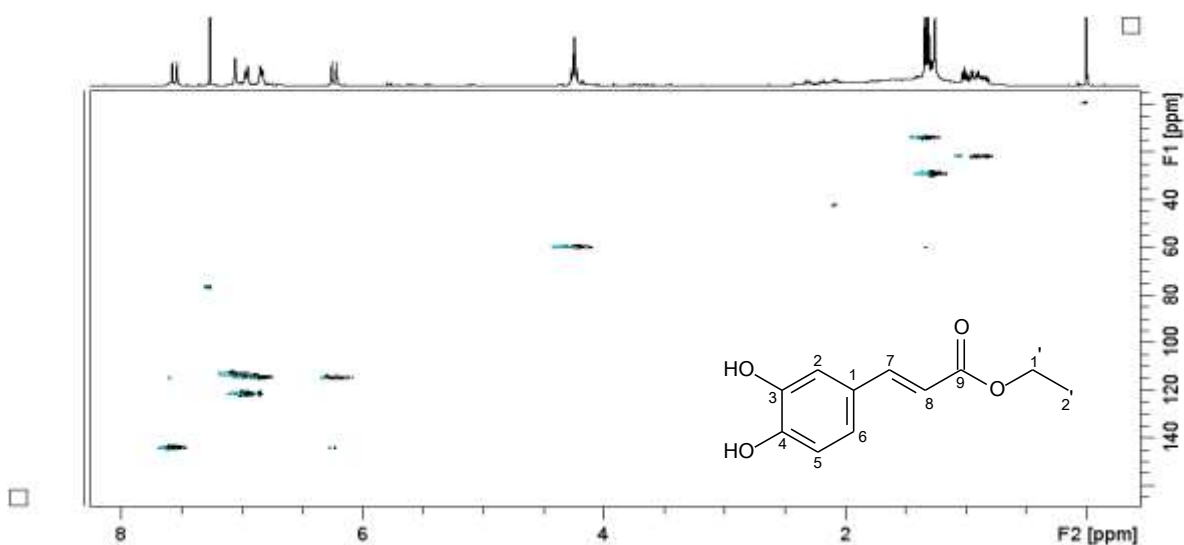


Figura 75 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CDCl_3) de **M20**.

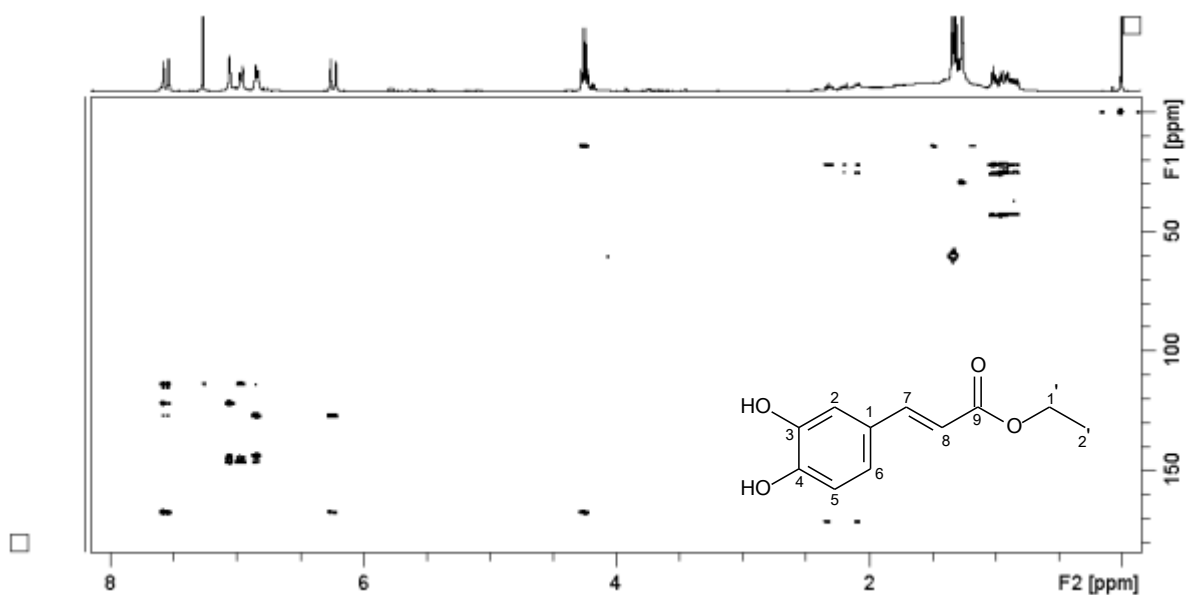


Figura 76 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CDCl_3) de **M20**.

Tabela 16 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HMBC (400 MHz, CDCl_3) para **M20**.

Posição	δ_{H} (mult.; J em Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	-	127,6	-
2	7,05 (<i>s</i>)	114,5	4; 6; 7
3	-	143,9	-
4	-	146,4	-
5	6,84 (<i>d</i> , 8,0)	114,7	1; 3
6	6,96 (<i>d</i> , 8,0)	123,0	2; 4; 7
7	7,56 (<i>d</i> , 15,9)	144,9	2; 6; 9
8	6,24 (<i>d</i> , 15,9)	115,9	1; 9
9	-	167,8	-
1'	4,25 (<i>q</i> , 7,1)	60,6	2'; 9
2'	1,33 (<i>t</i> , 7,1)	14,4	1'

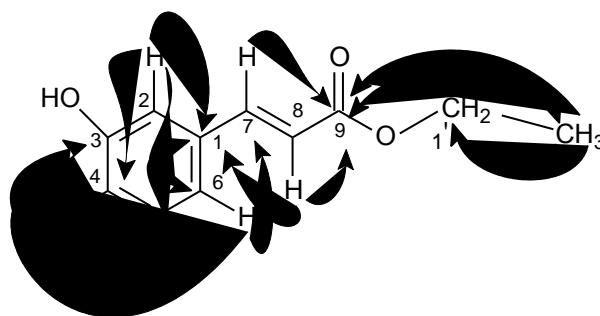


Figura 77 – Principais correlações observadas no mapa de correlação ^1H - ^{13}C longa distância de **M20**.

5.2.6 – Identificação das substâncias M28, M29, M30, M31, M32, M33, M34, M35, M36 e M37.

As substâncias **M28**, **M29**, **M30**, **M31**, **M32**, **M33**, **M34**, **M35**, **M36** e **M37** foram isoladas como sólidos brancos cristalinos, através da separação cromatográfica em CLAE, conforme os esquemas 6 – 7 (p. 38 – 40), a partir das frações mais polares das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

Os espectros de RMN de ^1H destas substâncias (Figura 81, p. 86; Figura 85, p. 88; Figura 89, p. 91; Figura 92, p. 92; Figuras 95 - 100, p. 93 - 94) foram muito semelhantes entre si, mostrando tratar-se de estruturas com o mesmo esqueleto básico. Foi possível observar a presença de uma unidade cafeoila (Figura 78, p. 84) caracterizada pela presença de sinais de três hidrogênios aromáticos entre δ 6,8 e 7,0, sendo dois dupletos em δ 7,03 (1,9 Hz; 1H) e δ 6,78 (8,2 Hz; 1H), e um duplo duplete em δ 6,95 (8,2; 1,9 Hz; 1H). Este conjunto de sinais evidenciou a existência de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Em adição, o espectro de RMN de ^1H mostrou dois dupletos em δ 7,53 (d ; 15,9 Hz; 1H), δ 6,21 (d ; 15,9 Hz; 1H), característicos de hidrogênios olefínicos de uma ligação dupla com configuração *trans* e conjugada à carbonila (H-7 e H-8).

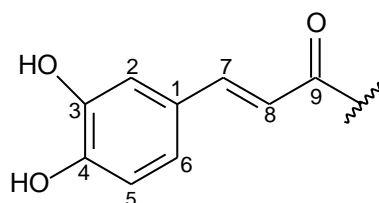


Figura 78 – Unidade cafeoila (LEE *et al.*, 2010).

Os espectros de RMN de ^1H de **M28** e **M29** apresentaram ainda, sinais característicos de uma unidade de ácido quínico esterificado (figura 79, p. 84).

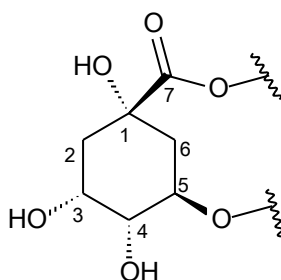


Figura 79 – Unidade do ácido quínico esterificado (LEE *et al.*, 2010).

No ácido quínico, os hidrogênios 3, 4 e 5, apresentam deslocamentos nas regiões de 3,3 a 4,1 ppm. Porém, a esterificação de qualquer das hidroxilas causa a desproteção do hidrogênio, com deslocamento do sinal de 1,5-2,0 ppm. Portanto, o número de hidrogênios na região de 5,0-6,0 ppm, permite verificar o número de substituições. Assim, para as substâncias **M28** e **M29** foi possível observar, na região de hidrogênios carbinólicos, um multiplete em δ 5,28 (*m*, 1H) referente ao H-5, um duplo duplete em δ 3,73 (7,5; 3,0 Hz; 1H) referente ao H-4, um sinal em δ 4,13 (*m*) referente ao H-3, o qual aparece sobreposto a outros sinais. Este conjunto de sinais evidenciou a presença de apenas uma esterificação da unidade quínica, na posição C-5. Diferentemente, as substâncias **M30**, **M31**, **M32**, **M33**, **M34**, **M35**, **M36** e **M37** apresentaram esterificação em duas hidroxilas, gerando os derivados dicafeoilquínicos. Além disso, foi possível observar que as substâncias **M28**, **M29**, **M30**, **M31**, **M32**, **M33** e **M35** apresentaram esterificação na carboxila do ácido quínico (C-7).

Através da análise dos mapas de correlação a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) dessas substâncias (Figuras 83-84, p. 87; Figuras 86-87, p. 88; Figuras 90-91, p. 91; Figuras 93-94, p. 92; Figuras 96-97, p. 93; Figuras 99-100, p. 94; Figuras 102-103, p. 95; Figuras 105-106, p. 96; Figuras 108-109, p. 97; Figuras 111-112, p. 98; Tabelas 17 – 20; p. 90 - 101) foi possível confirmar a ligação entre a unidade cafeoila e o ácido quínico, pois o hidrogênio em δ 5,28 apresentou correlação com uma carbonila em δ 168,5. Nestas análises pode-se constatar para **M29**, **M30**, **M32**, **M33**, a presença de um grupo etila (sinais em δ_c 62,6 e 14,4), sendo que o grupo metilênico (δ_H 4,13 *m*) mostrava correlação com um carbono em δ 175,1, indicando esterificação no grupo carboxílico do ácido quínico. Enquanto que, para **M28**, **M31**, **M35**, observou-se a ausência destes sinais, porém, ficou evidenciada a presença de uma metoxila, (δ 58,8), mostrando correlação com um carbono em δ 175,1, indicando um éster metílico do ácido quínico.

A análise de todos esses dados, juntamente com a literatura, permitiu identificar dois ésteres do ácido clorogênico, o clorogenato de metila (**M28**) e o clorogenato de etila (**M29**), além de vários ésteres dos ácidos dicafeoilquínicos: 3,4-dicafeoilquinato de etila (**M30**), 3,4-dicafeoilquinato de metila (**M31**), 3,5-dicafeoilquinato de etila (**M32**), 4,5-dicafeoilquinato de etila (**M33**) e 3,4-dicafeoilquinato de metila (**M35**). Também foram encontrados os ácidos 3,5-dicafeoilquínico (**M34**), 4,5-dicafeoilquínico (**M36**) e 3,4-dicafeoilquínico (**M37**). Estas substâncias foram encontradas em algumas espécies como *Lonicera japonica* e *Ipomoea batatas* (ABE *et al.*, 1972, LEE *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2007). No entanto, este é o primeiro relato de seu isolamento no gênero *Moquiniastrum*.

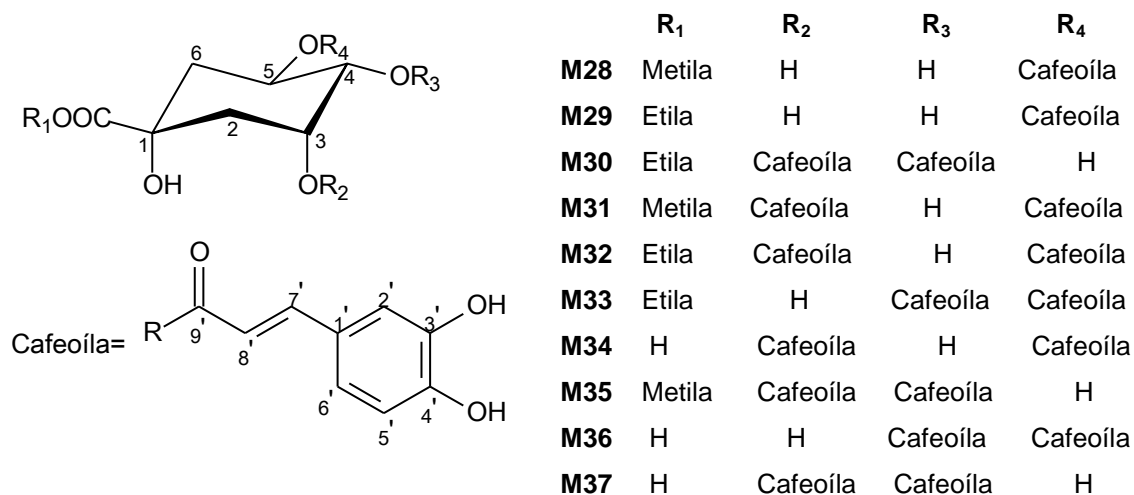


Figura 80 – Estruturas das substâncias **M28** (clorogenato de metila), **M29** (clorogenato de etila), **M30** (3,4-dicafeoilquinato de etila), **M31** (3,5-dicafeoilquinato de metila), **M32** (3,5-dicafeoilquinato de etila), **M33** (4,5-dicafeoilquinato de etila), **M34** (ácido 3,5-dicafeoilquínico), **M35** (4,5-dicafeoilquinato de metila), **M36** (ácido 4,5-dicafeoilquínico), e **M37** (ácido 3,4-dicafeoilquínico).

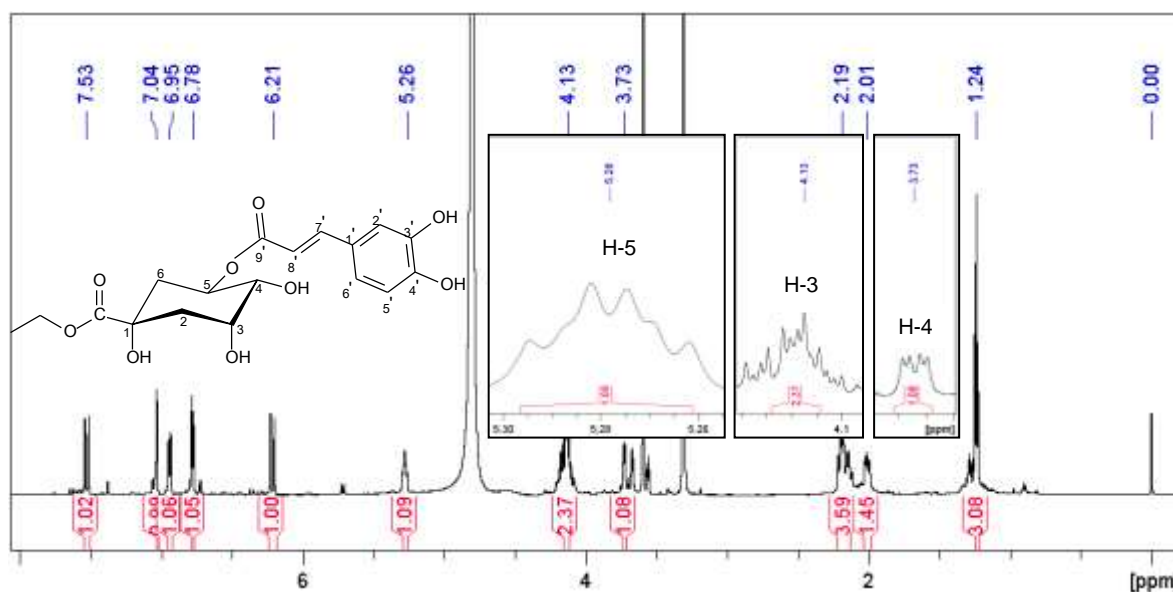


Figura 81 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de **M29**.

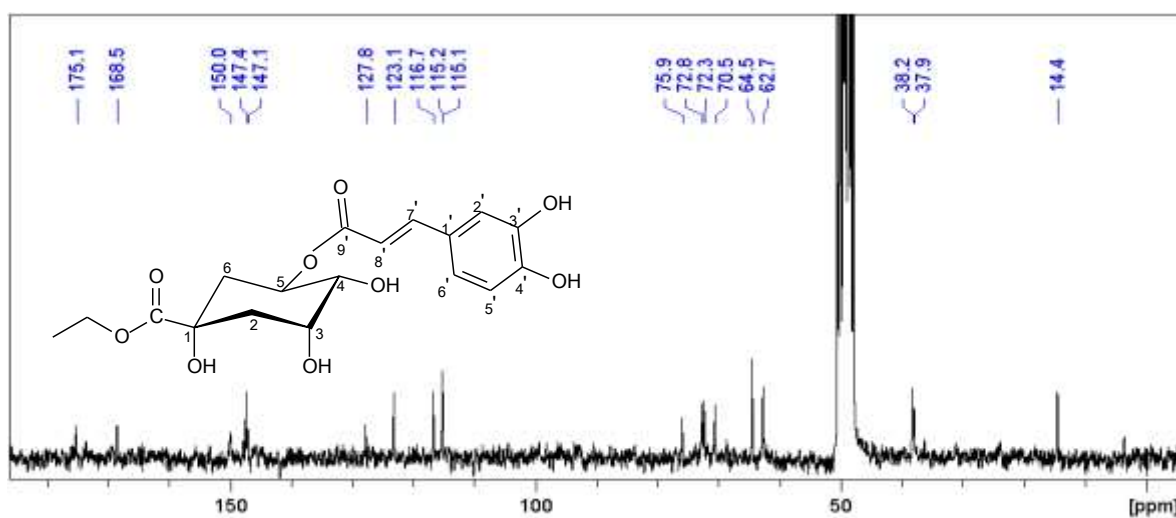


Figura 82 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, CD_3OD) de **M29**.

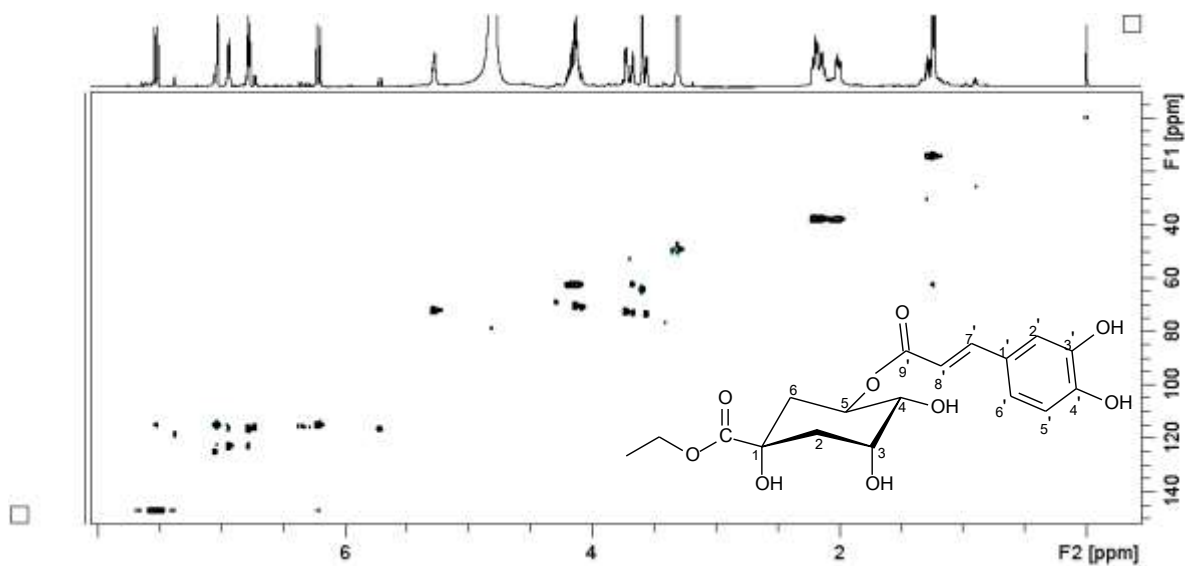


Figura 83 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de **M29**.

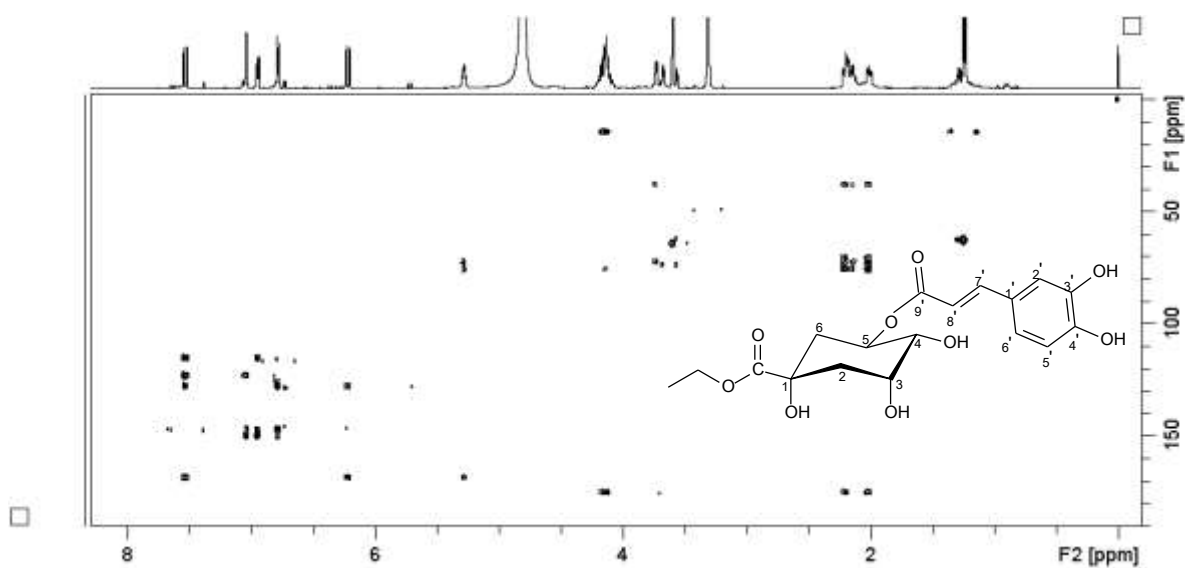


Figura 84 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de **M29**.

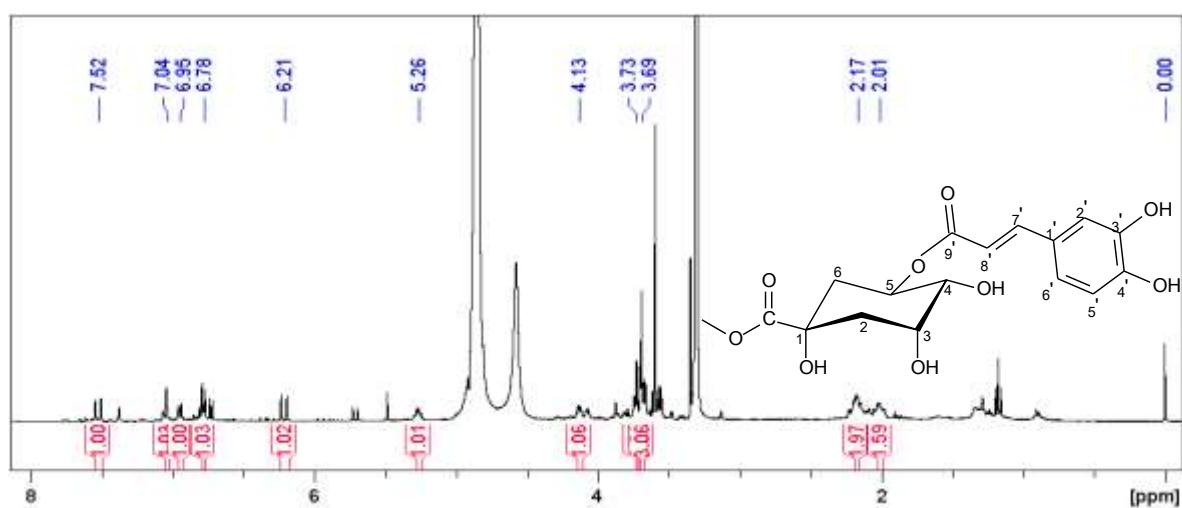


Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **M28**.

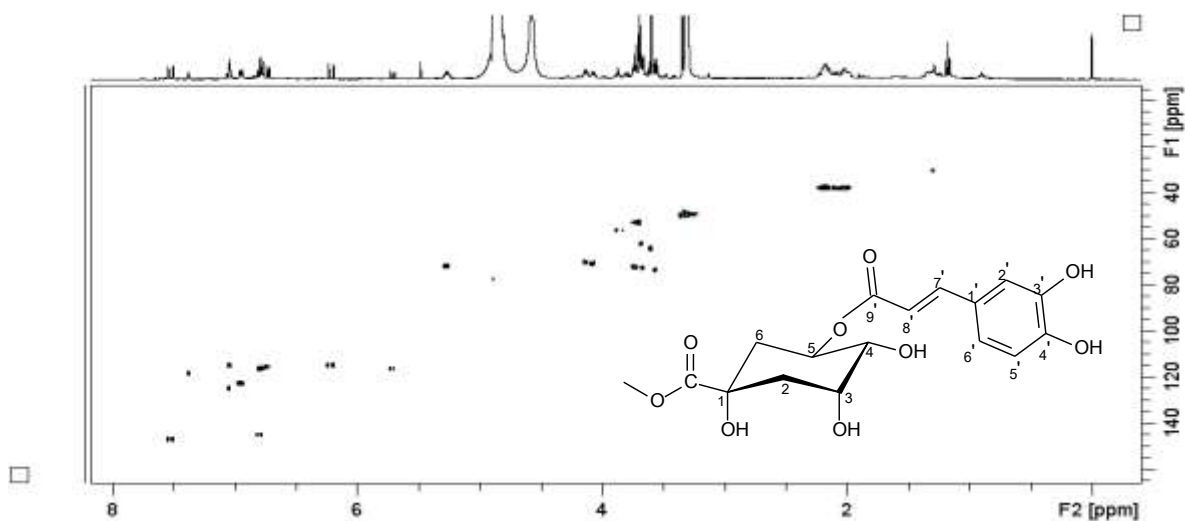


Figura 86 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M28**.

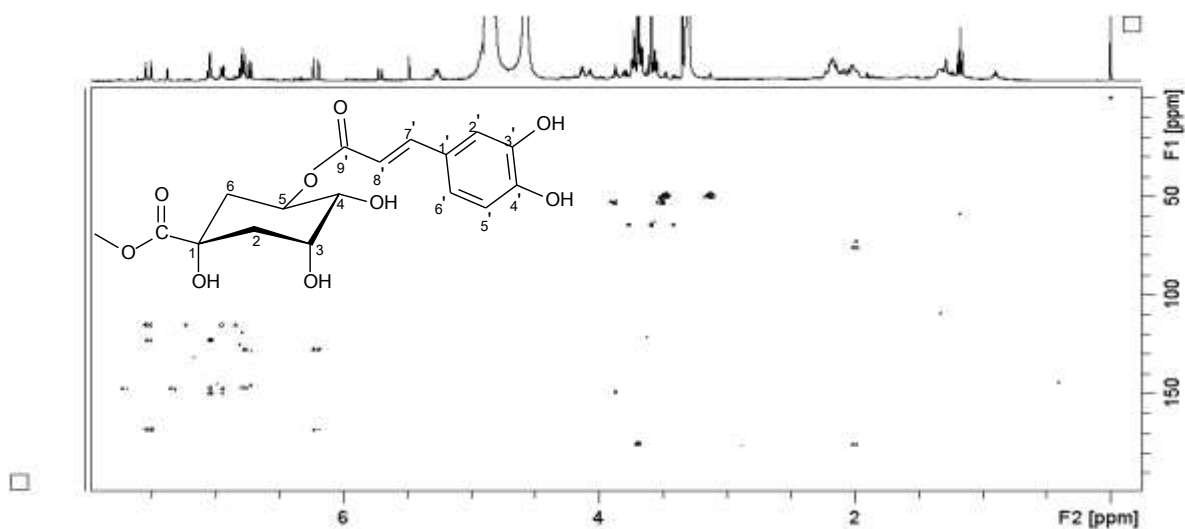


Figura 87 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M28**.

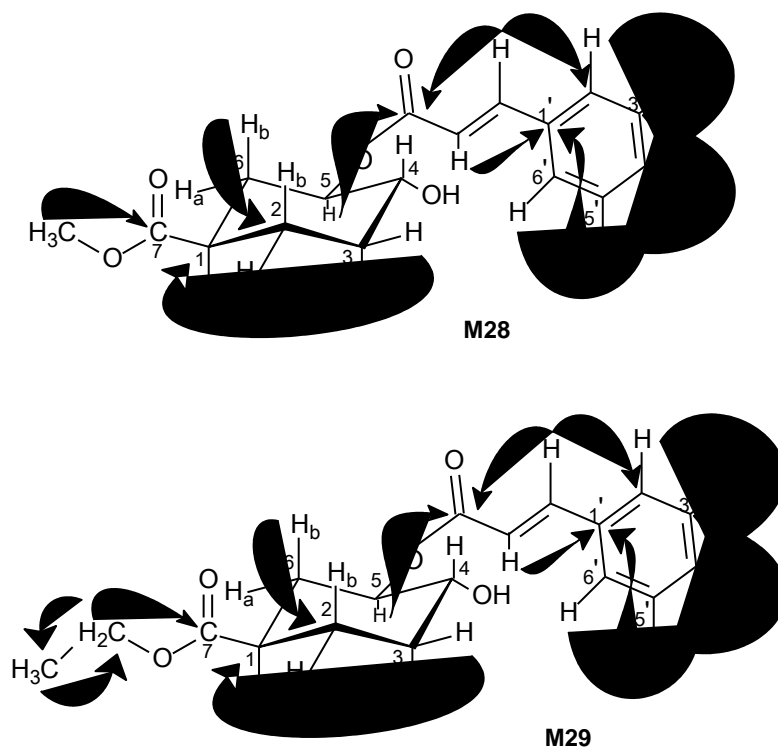


Figura 88 – Principais correlações observadas nos mapas de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância de **M28** e **M29**.

Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (600 MHz, CD_3OD) para **M28** e **M29**.

Posição	M28			M29		
	δ_{H} (mult.; J em Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	δ_{H} (mult.; J em Hz)	δ_{C}	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	-	75,8	-	-	75,9	-
2a	2,17 (<i>dd</i> , 13,3; 3,3)	38,0	4, 6	2,19 (<i>dd</i> , 13,3; 3,3)	38,2	4, 6
2b	2,01 (<i>dd</i> , 13,3; 6,5)			2,01 (<i>dd</i> , 13,3; 6,6)		
3	4,13 (<i>m</i>)	70,6	1, 5	4,13 (<i>m</i>)	70,5	1, 5
4	3,73 (<i>dd</i> , 7,5; 3,0)	72,8	2, 6	3,73 (<i>dd</i> , 7,5; 3,0)	72,8	2, 6
5	5,26 (<i>ddd</i> , 12,0; 7,5; 4,7)	72,3	1, 3	5,28 (<i>ddd</i> , 12,0; 7,5; 4,7)	72,3	1, 3
6a	2,17 (<i>m</i>)	37,8	2, 4	2,16 (<i>m</i>)	37,9	2, 4
6b	2,18 (<i>m</i>)			2,14 (<i>m</i>)		
7	-	175,6	-	-	175,1	-
1'	-	127,8	-	-	127,7	-
2'	7,04 (<i>d</i> , 2,0)	115,2	4'; 6'; 7'	7,04 (<i>d</i> , 1,9)	115,2	4'; 6'; 7'
3'	-	147,1	-	-	147,1	-
4'	-	150,0	-	-	150,0	-
5'	6,78 (<i>d</i> , 8,2)	116,7	1'; 3'	6,78 (<i>d</i> , 8,2)	116,7	1'; 3'
6'	6,95 (<i>d</i> , 8,2; 1,9)	123,7	2'; 4'; 7'	6,95 (<i>d</i> , 8,2; 1,9)	123,1	2'; 4'; 7'
7'	7,52 (<i>d</i> , 15,9)	147,4	2'; 6'; 9'	7,53 (<i>d</i> , 15,9)	147,4	2'; 6'; 9'
8'	6,21 (<i>d</i> , 15,9)	115,1	1'; 9'	6,21 (<i>d</i> , 15,9)	115,1	1'; 9'
9'	-	168,5	-	-	168,5	-
COOCH_3	3,69 (<i>s</i>)	58,8	7 (175,6)	-	-	-
COOCH_2	-	-	-	4,13 (<i>q</i> , 7,2)	62,7	7 (175,1)
CH_3	-	-	-	1,24 (<i>t</i> , 7,2)	14,4	1''' (62,7)

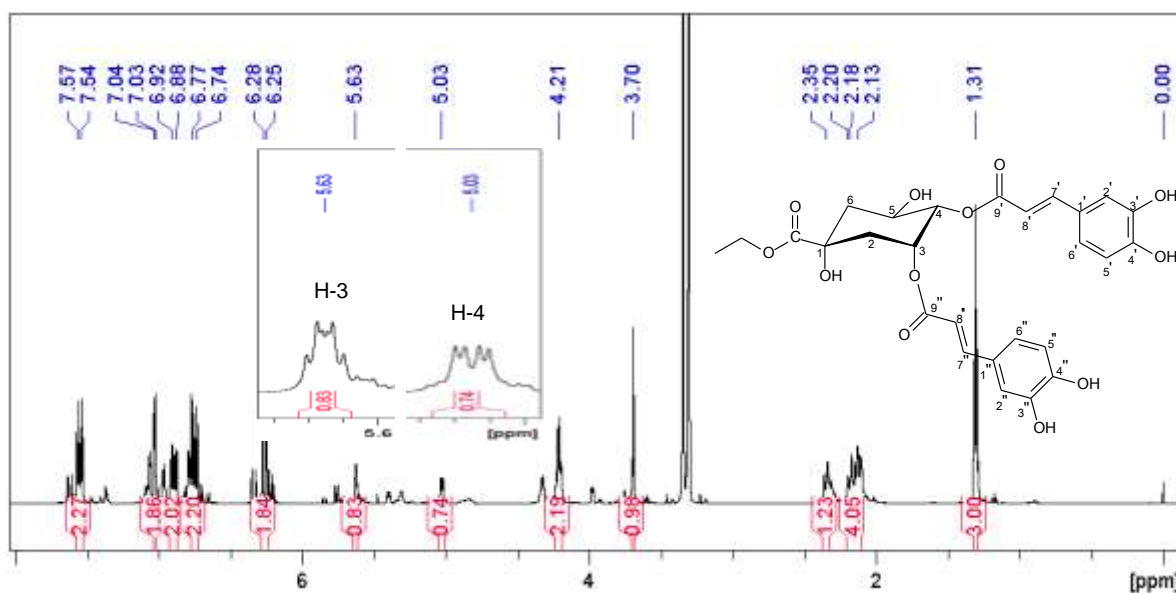


Figura 89 – Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) de **M30**.

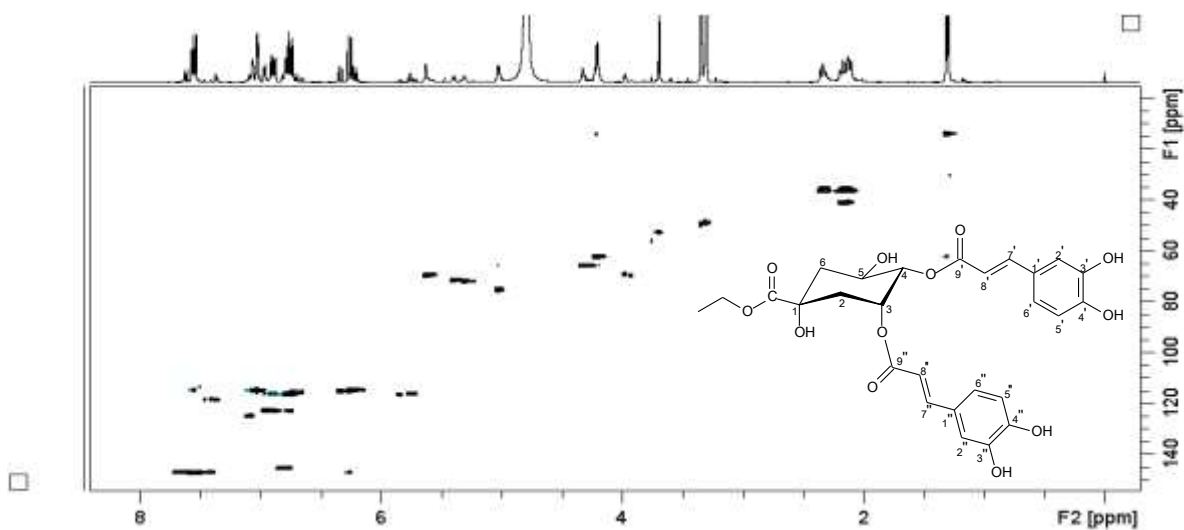


Figura 90 – Mapa de correlação ¹H-¹³C a uma ligação (600 MHz, CD₃OD) de **M30**.

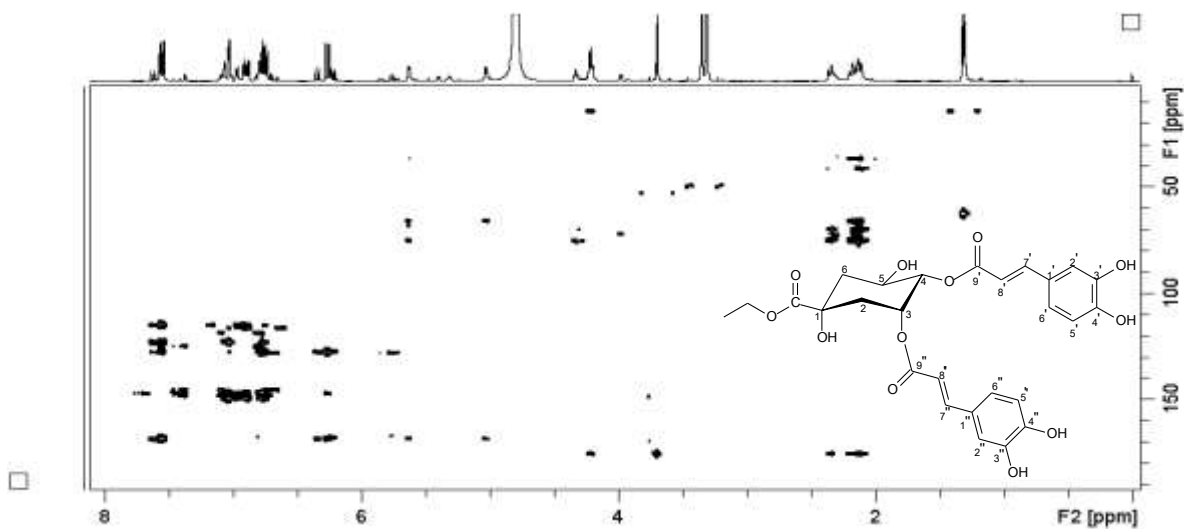


Figura 91 – Mapa de correlação ¹H-¹³C a longa distância (600 MHz, CD₃OD) de **M30**.

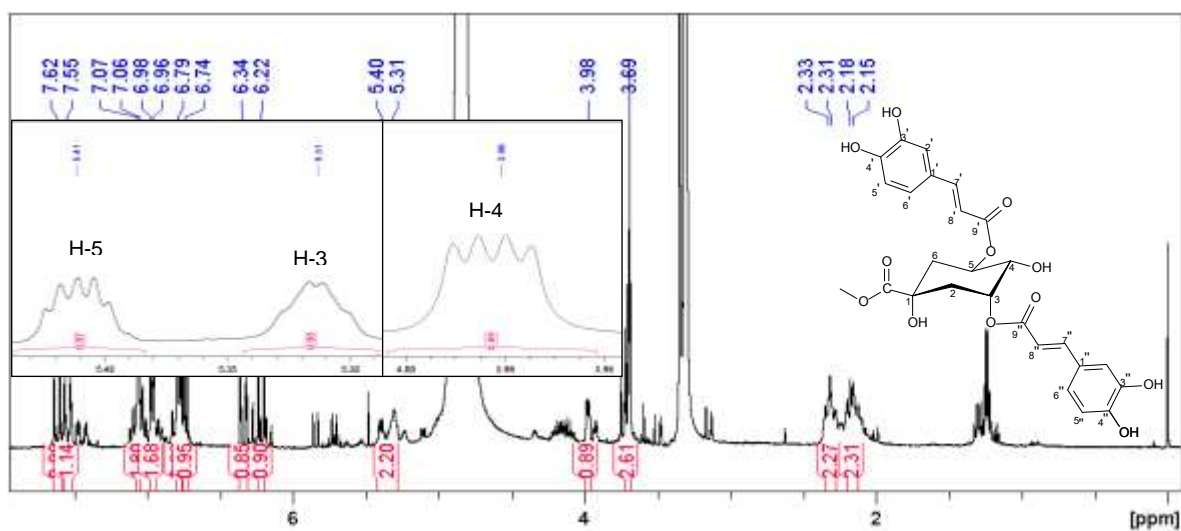


Figura 92 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **M31**.

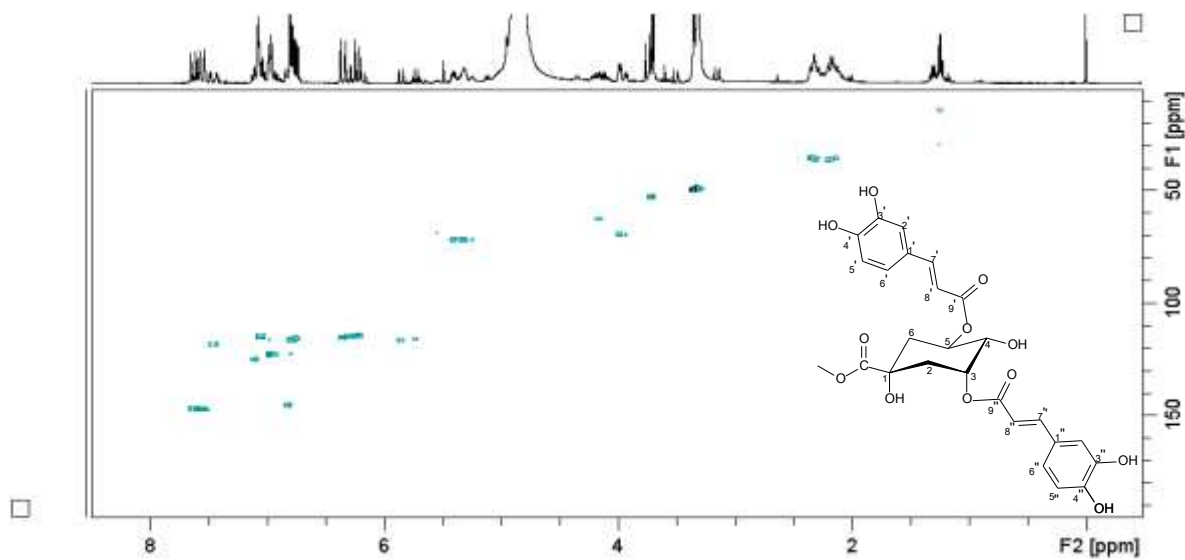


Figura 93 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M31**.

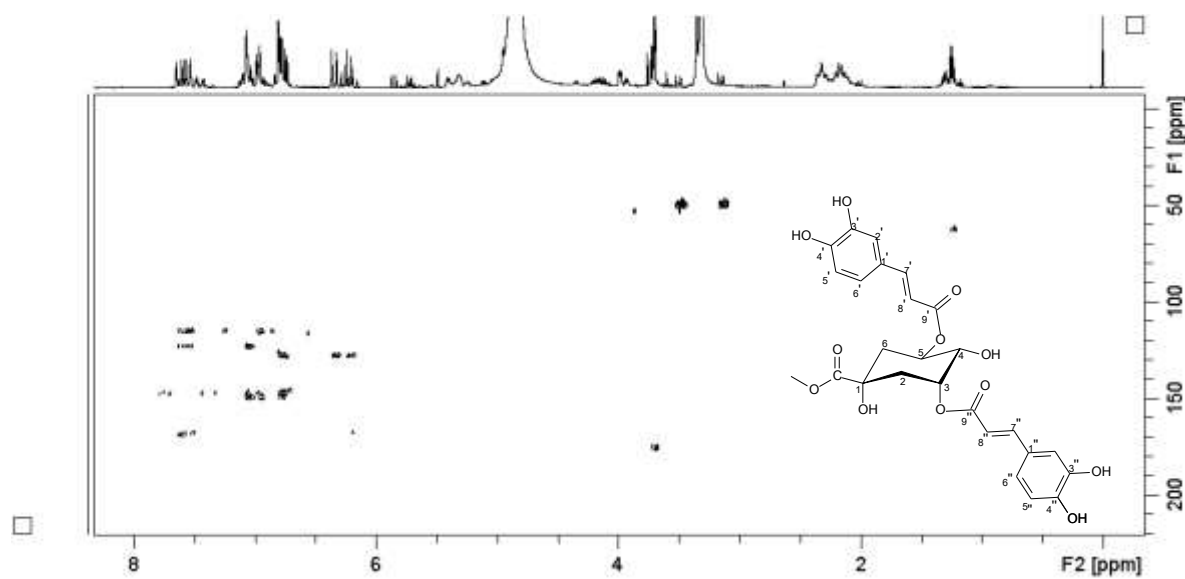


Figura 94 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M31**.

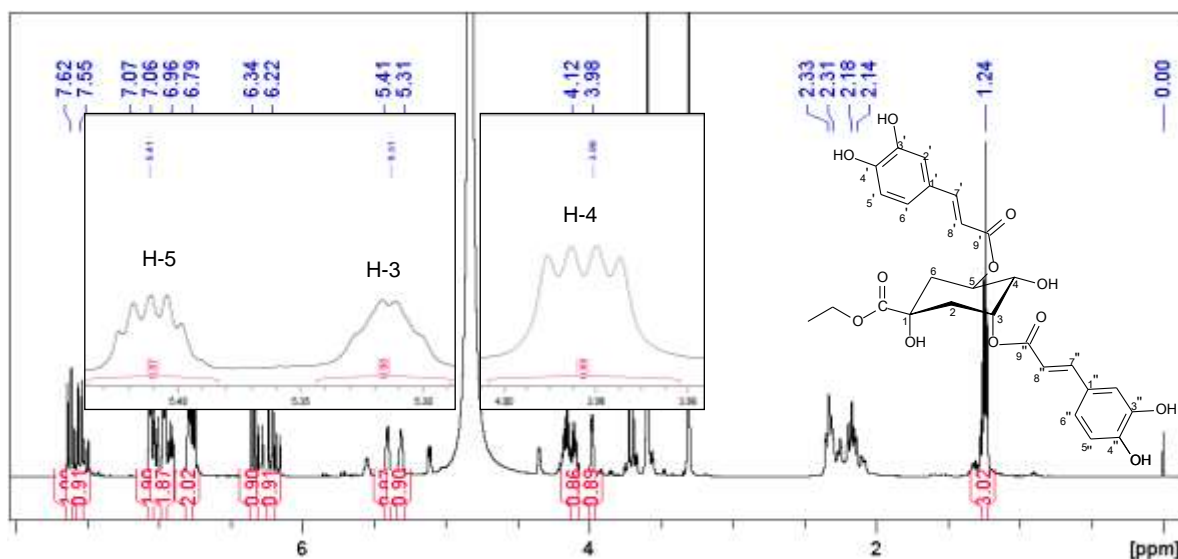


Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de **M32**.

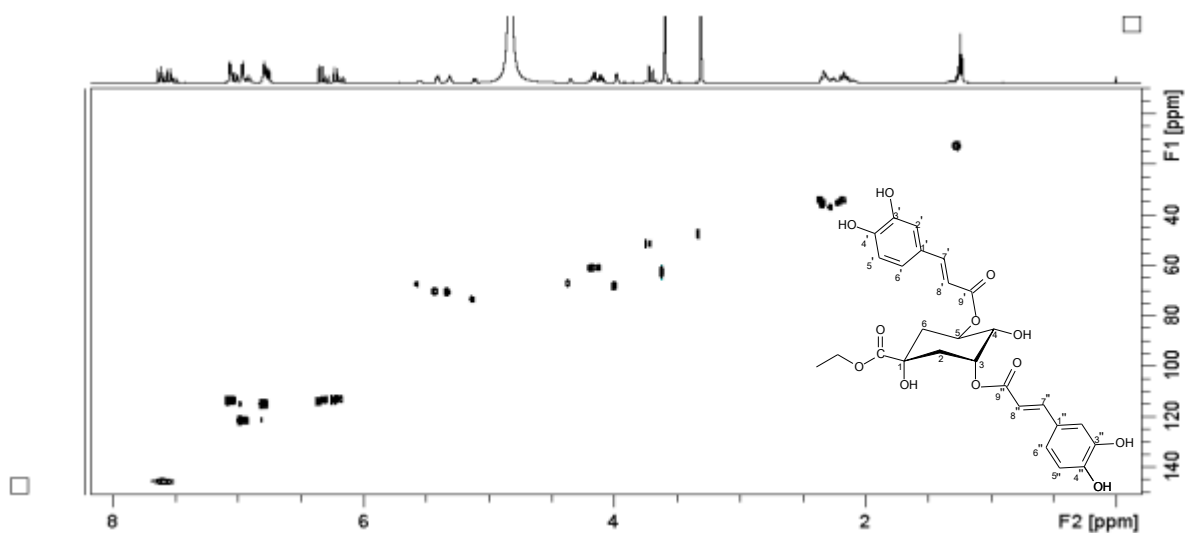


Figura 96 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de **M32**.

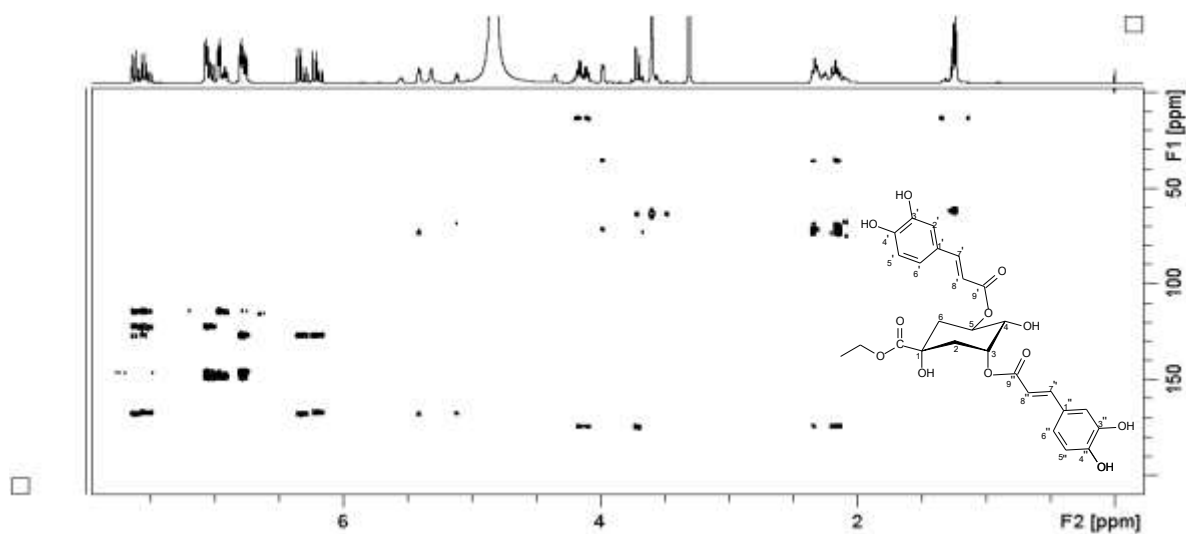


Figura 97 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de **M32**.

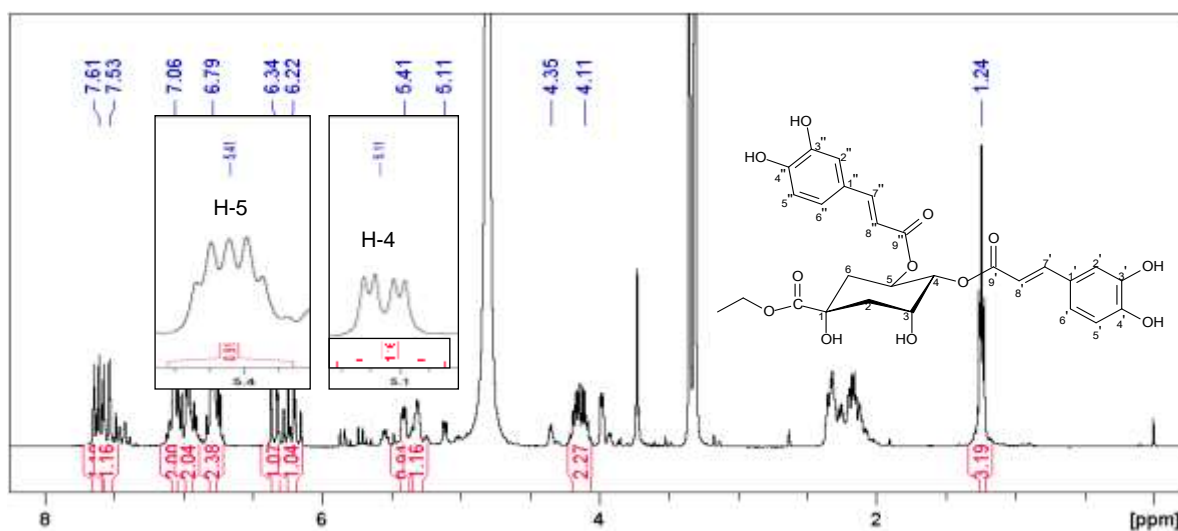


Figura 98 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) de **M33**.

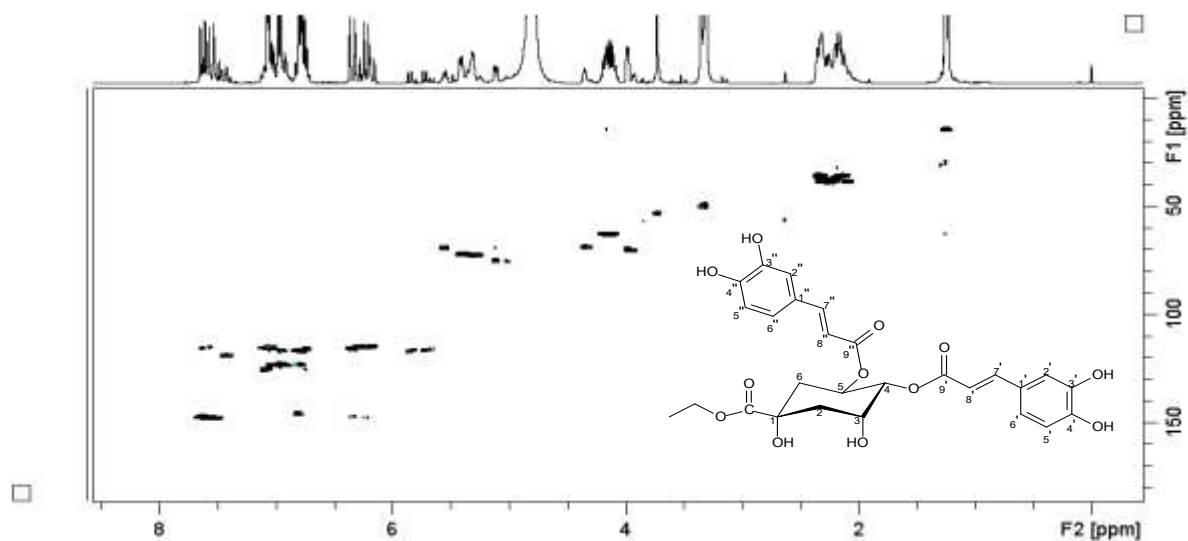


Figura 99 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) de **M33**.

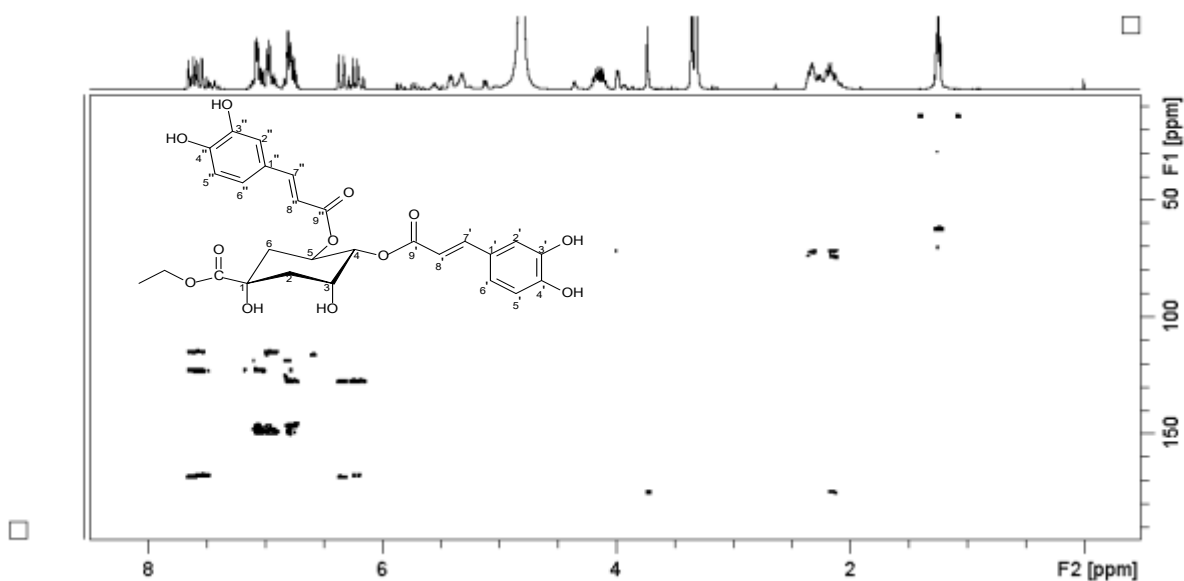


Figura 100 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) de **M33**.

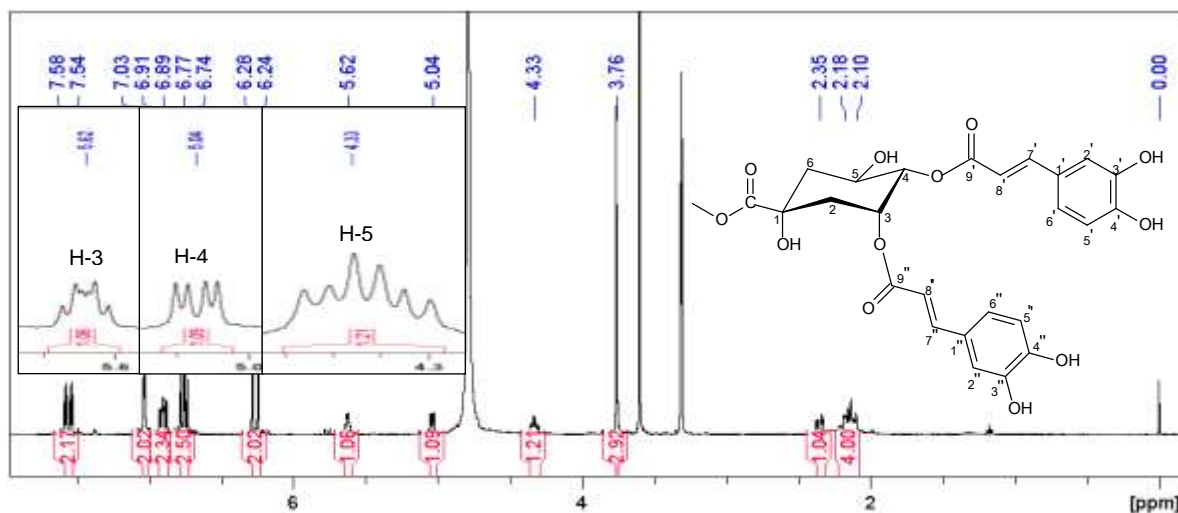


Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **M35**.

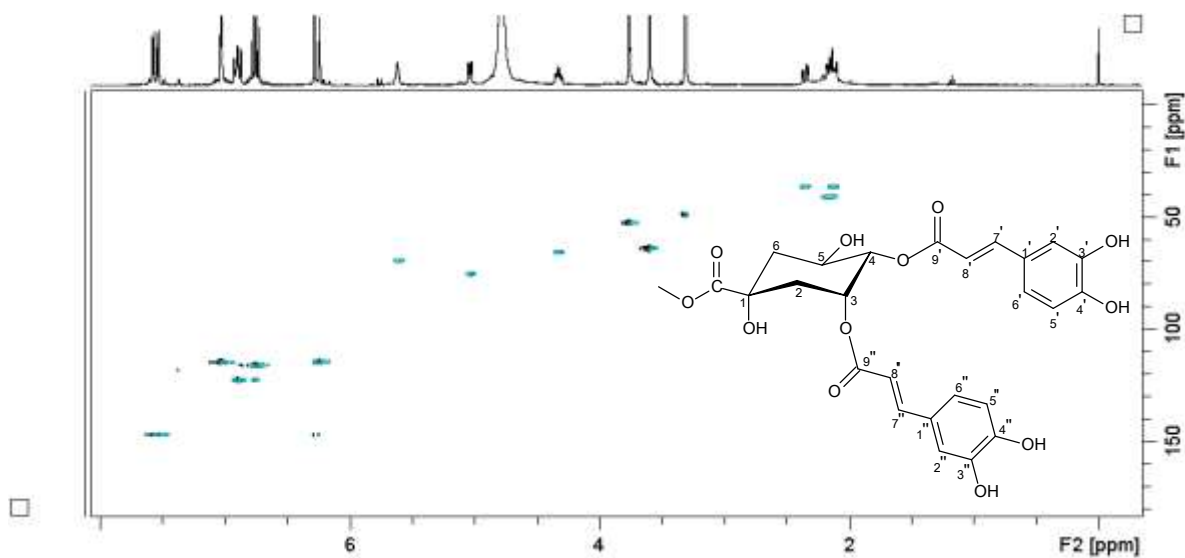


Figura 102 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M35**.

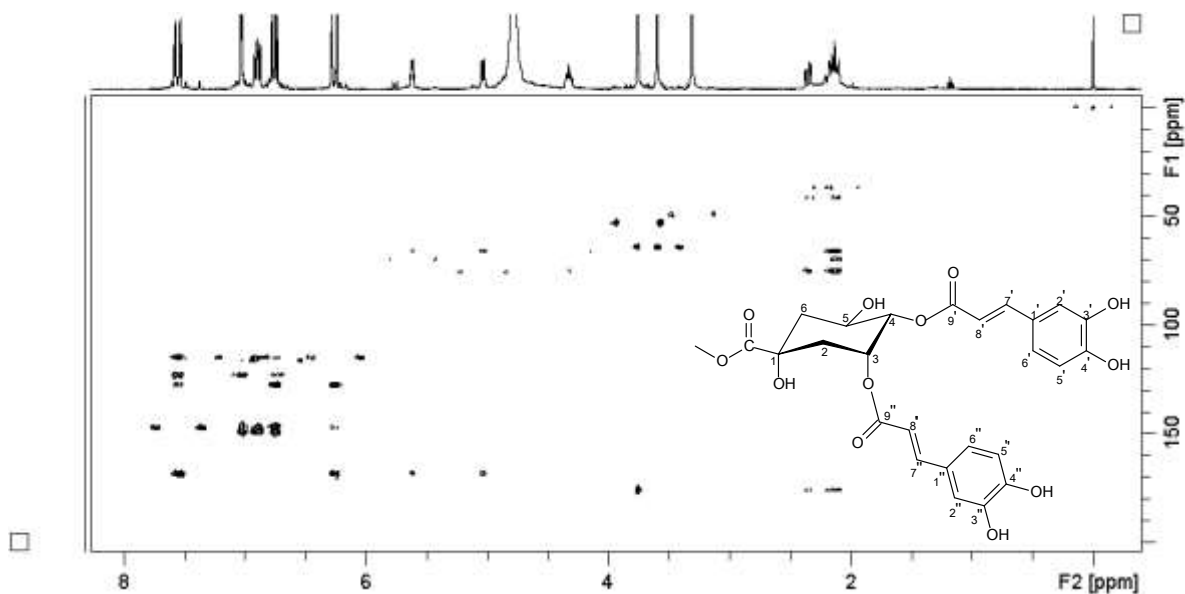


Figura 103 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M35**.

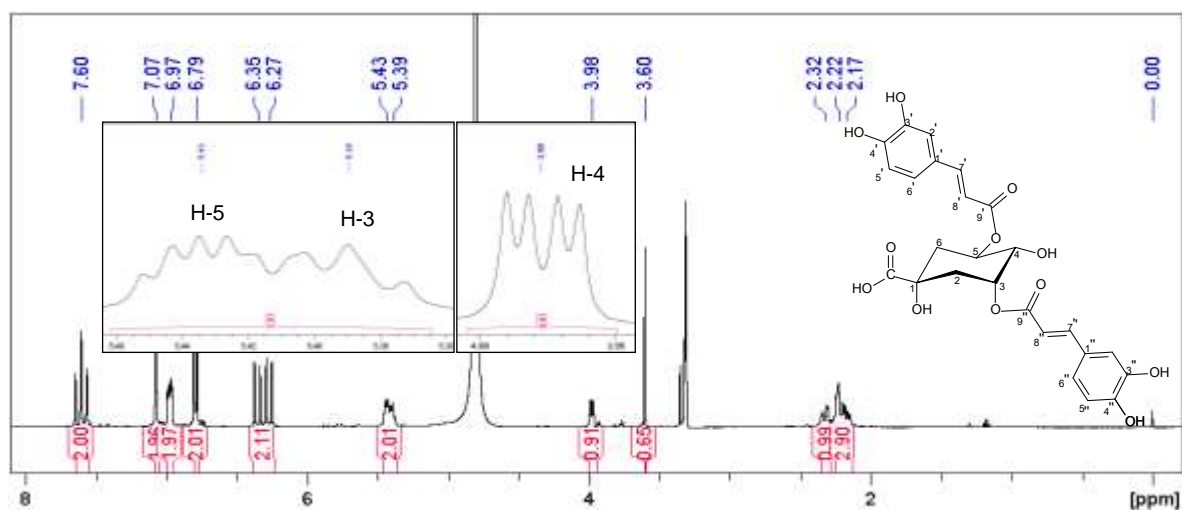


Figura 104 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **M34**.

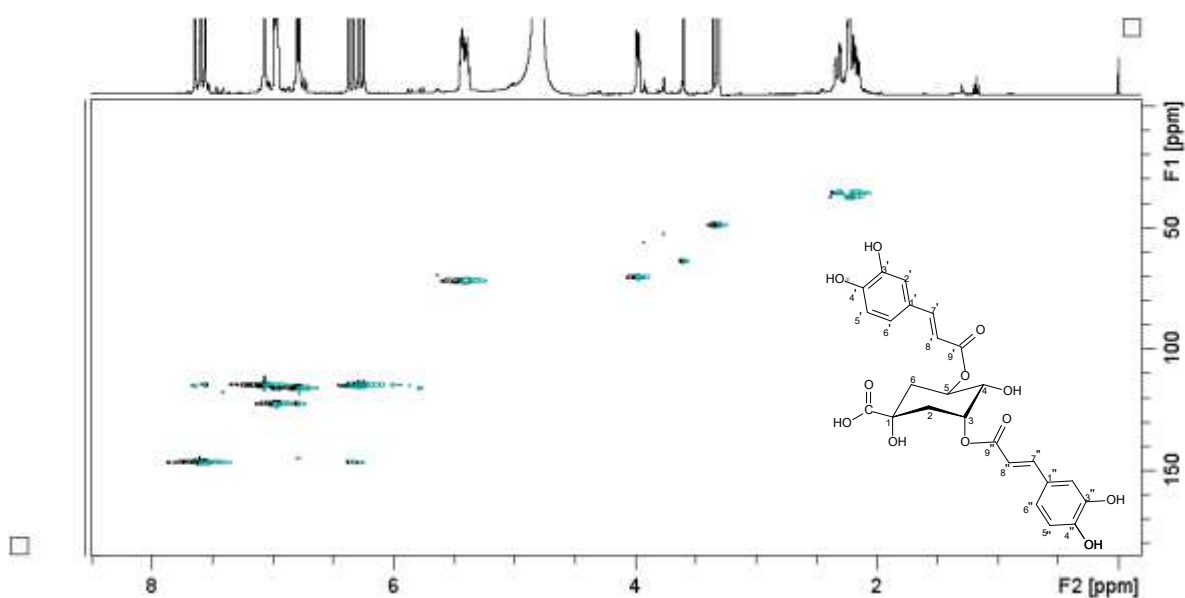


Figura 105 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M34**.

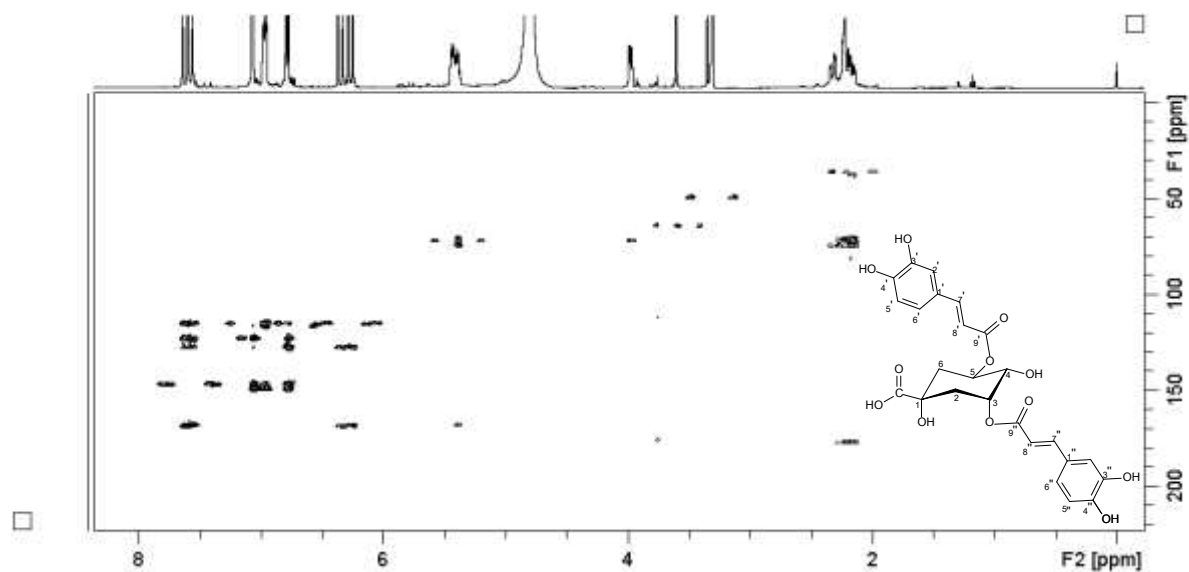


Figura 106 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M34**.

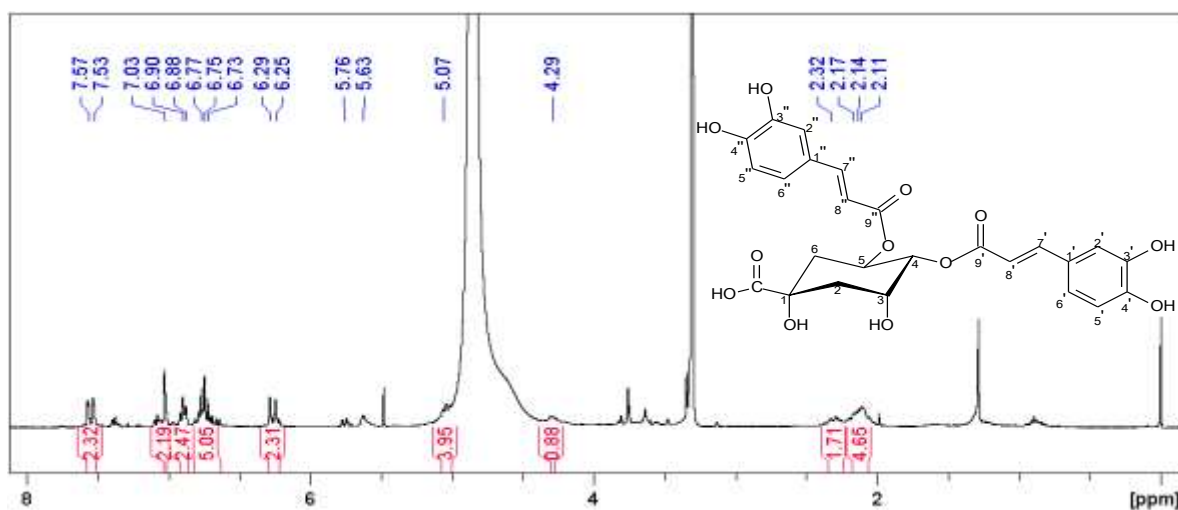


Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M36**.

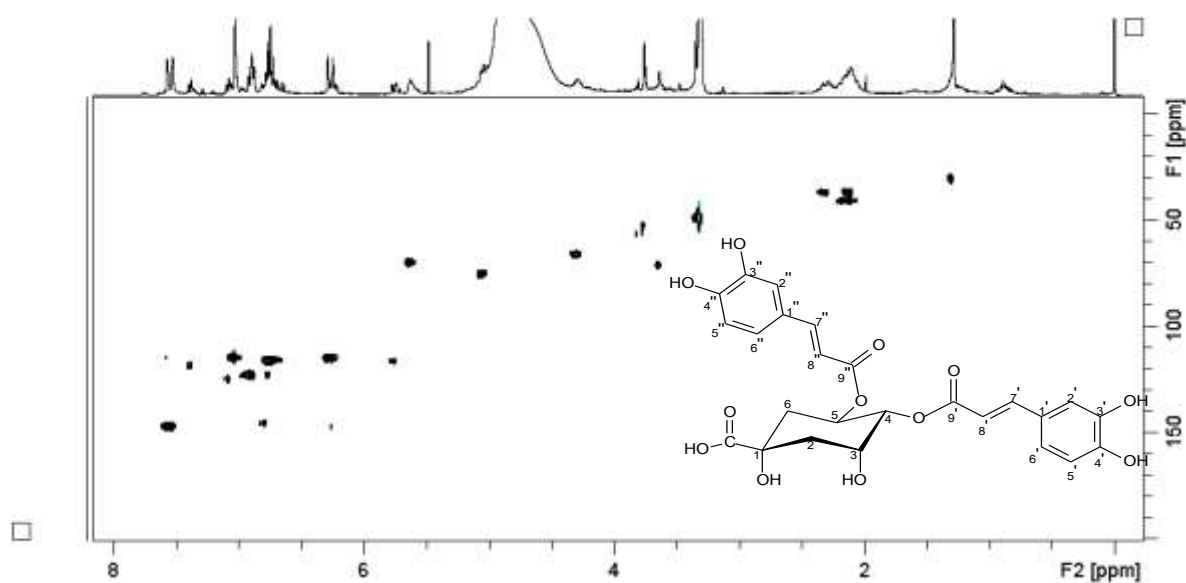


Figura 108 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M36**.

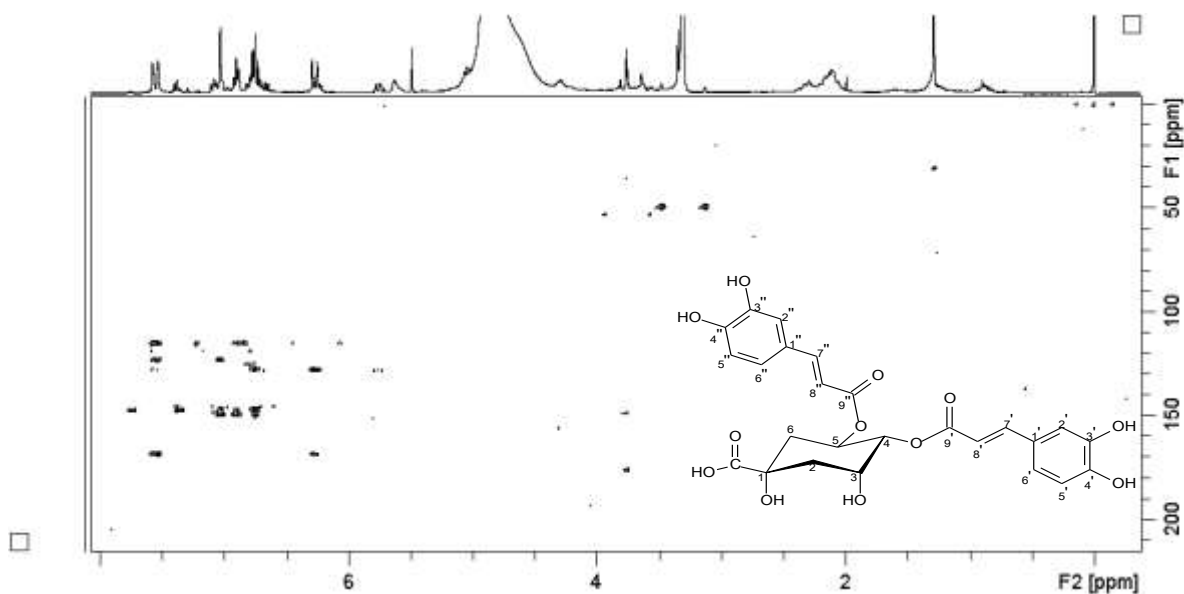


Figura 109 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M36**.

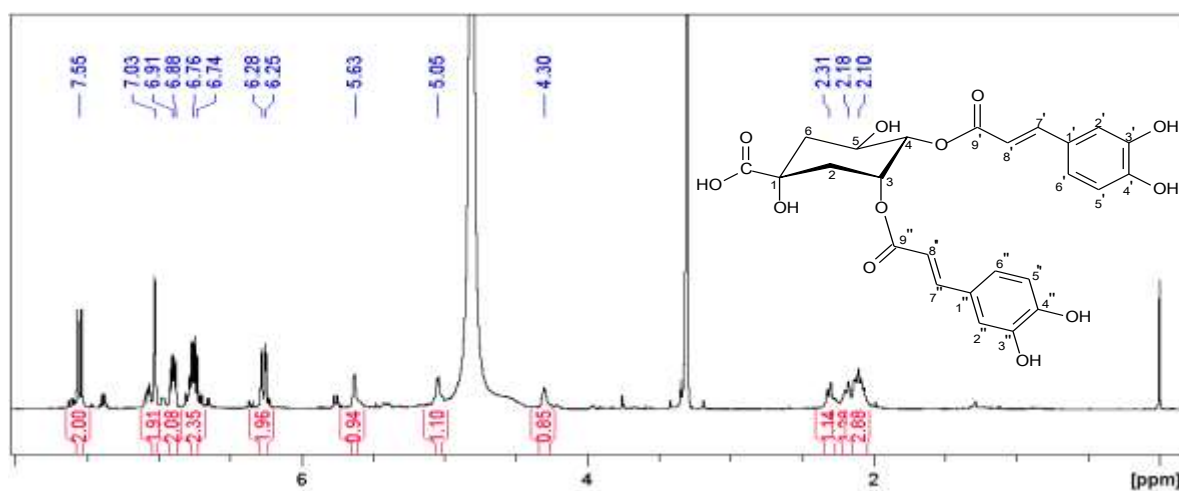


Figura 110 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **M37**.

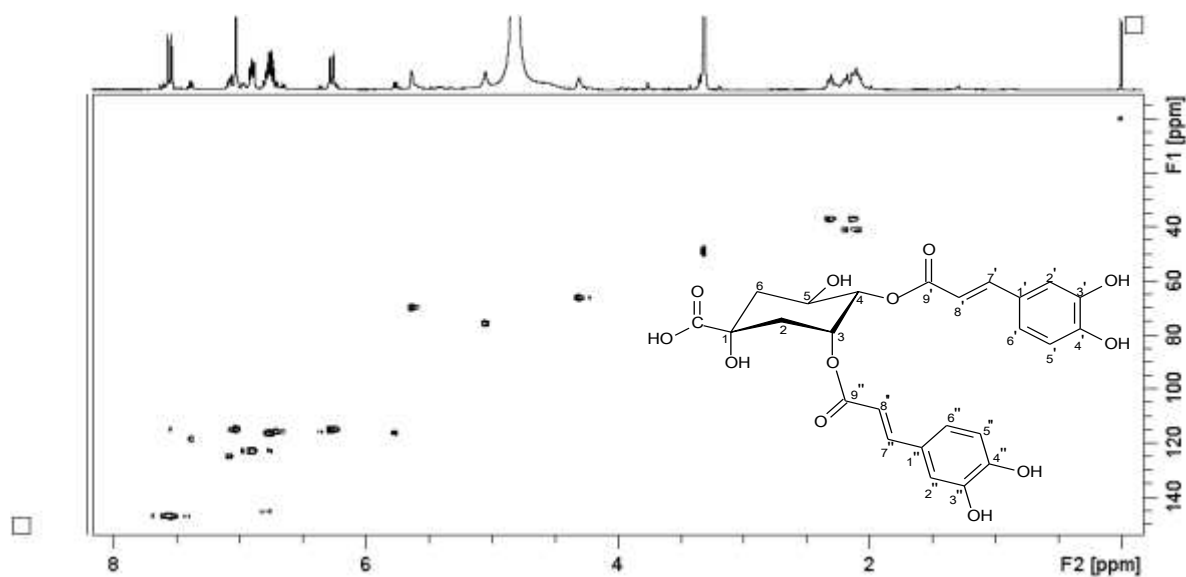


Figura 111 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (400 MHz, CD_3OD) de **M37**.

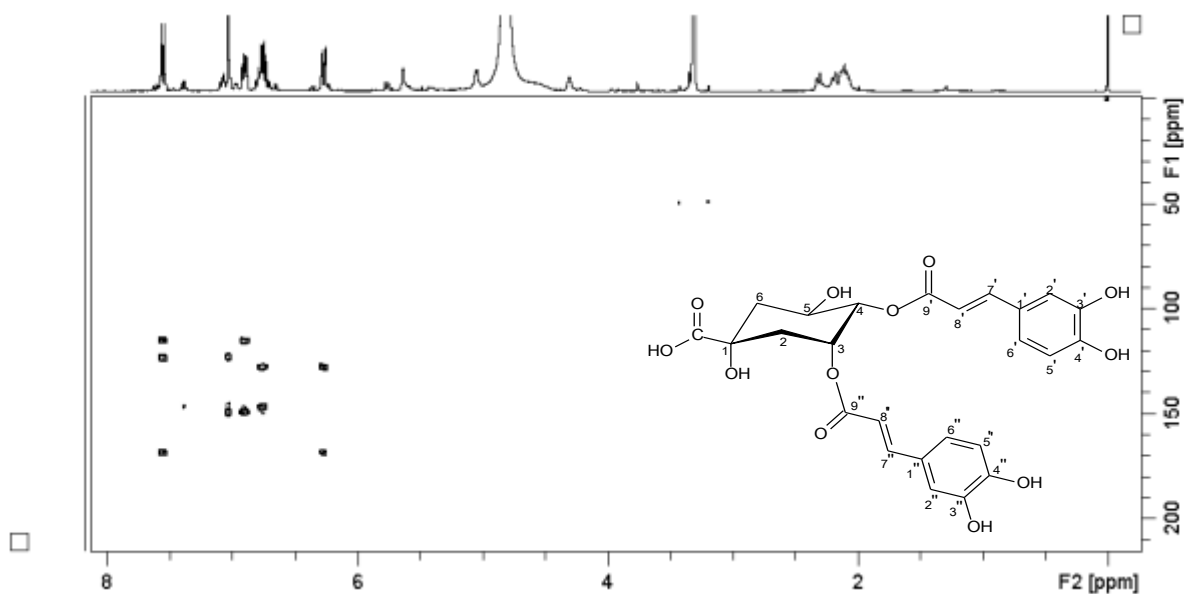


Figura 112 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz, CD_3OD) de **M37**.

Tabela 18 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz, CD_3OD) para **M30**, **M32** e **M33**.

Posição	M30		M32		M33	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)
1	74,8	-	74,0	-	74,8	-
2a	36,7	2,33 (<i>m</i>)	35,8	2,33 (<i>m</i>)	35,7	2,32 (<i>m</i>)
2b		2,10 (<i>m</i>)		2,13 (<i>m</i>)		2,16 (<i>m</i>)
3	69,8	5,63 (<i>m</i>)	72,2	5,31 (<i>m</i>)	68,7	4,35 (<i>m</i>)
4	75,6	5,03 (<i>dd</i> , 8,4; 3,4)	69,6	3,98 (<i>dd</i> , 6,5; 3,3)	74,9	5,11 (<i>dd</i> , 6,5; 3,3)
5	66,0	4,20 (<i>m</i>)	71,9	5,41 (<i>dd</i> , 8,0; 4,0)	69,0	5,41 (<i>m</i>)
6a	41,2	2,18 (<i>m</i>)	36,8	2,31 (<i>m</i>)	38,4	2,18 (<i>m</i>)
6b		2,13 (<i>m</i>)		2,18 (<i>m</i>)		2,32 (<i>m</i>)
7	175,8	-	175,1	-	175,2	-
1'	127,8	-	127,5	-	127,8	-
2'	114,9	7,03, (<i>d</i> , 1,9)	115,2	7,06 (<i>d</i> , 1,9)	115,1	7,06 (<i>d</i> , 1,9)
3'	146,5	-	146,8	-	146,5	-
4'	149,5	-	149,7	-	149,6	-
5'	116,4	6,74 (<i>d</i> , 8,2)	116,4	6,79 (<i>d</i> , 8,2)	116,5	6,79 (<i>d</i> , 8,2)
6'	122,9	6,88 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	122,9	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	123,6	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)
7'	147,2	7,54 (<i>d</i> , 15,9)	147,3	7,62 (<i>d</i> , 15,9)	147,4	7,53 (<i>d</i> , 15,9)
8'	114,9	6,25 (<i>d</i> , 15,9)	115,4	6,34 (<i>d</i> , 15,9)	114,5	6,34 (<i>d</i> , 15,9)
9'	168,7	-	168,7	-	167,9	-
1''	127,8	-	127,5	-	127,5	-
2''	114,9	7,04, (<i>d</i> , 1,9)	115,2	7,07 (<i>d</i> , 1,8)	115,1	7,06 (<i>d</i> , 1,9)
3''	146,5	-	146,8	-	146,5	-
4''	149,5	-	149,8	-	149,6	-
5''	116,4	6,74 (<i>d</i> , 8,2)	116,4	6,78 (<i>d</i> , 8,2)	116,4	6,76 (<i>d</i> , 8,2)
6''	123,0	6,88 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	122,9	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	123,6	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)
7''	147,2	7,57 (<i>d</i> , 15,9)	147,3	7,55 (<i>d</i> , 15,9)	147,2	7,61 (<i>d</i> , 15,9)
8''	115,0	6,25 (<i>d</i> , 15,9)	115,4	6,22 (<i>d</i> , 15,9)	114,8	6,22 (<i>d</i> , 15,9)
9''	168,8	-	168,7	-	168,7	-
OCH ₂	62,5	4,20 (<i>q</i> , 7,1)	62,5	4,12 (<i>q</i> , 7,1)	62,6	4,11 (<i>q</i> , 7,1)
CH ₃	14,4	1,31 (<i>t</i> , 7,1)	14,2	1,24 (<i>t</i> , 7,1)	14,4	1,24 (<i>t</i> , 7,1)

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz, CD_3OD) para **M31** e **M35**.

Posição	M31		M35	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)
1	74,8	-	74,9	-
2a	35,7	2,33 (<i>dd</i> , 14,2; 3,6)	36,7	2,33 (<i>m</i>)
2b		2,17 (<i>dd</i> , 14,2; 7,2)		2,13 (<i>m</i>)
3	72,1	5,31 (<i>m</i>)	65,9	5,62 (<i>ddd</i> , 12,0; 9,1; 4,6)
4	69,6	3,98 (<i>dd</i> , 6,7; 3,2)	75,5	5,04 (<i>dd</i> , 8,2; 3,3)
5	72,0	5,40 (<i>dd</i> , 7,8; 3,7)	69,7	4,33 (<i>ddd</i> , 4,2; 4,2; 4,0)
6a	36,2	2,31 (<i>m</i>)	41,1	2,18 (<i>m</i>)
6b		2,18 (<i>m</i>)		2,20 (<i>m</i>)
7	175,5	-	175,9	-
1'	127,8	-	127,9	-
2'	115,0	7,03, (<i>d</i> , 2,1)	114,9	7,03 (<i>d</i> , 2,1)
3'	146,7	-	147,0	-
4'	149,4	-	149,5	-
5'	116,3	6,74 (<i>d</i> , 8,2)	116,3	6,74 (<i>d</i> , 8,2)
6'	123,0	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	123,0	6,89 (<i>dd</i> , 8,2; 2,1)
7'	147,4	7,58 (<i>d</i> , 15,9)	147,2	7,54 (<i>d</i> , 15,9)
8'	115,1	6,22 (<i>d</i> , 15,9)	115,1	6,24 (<i>d</i> , 15,9)
9'	168,0	-	168,4	-
1''	127,8	-	127,9	-
2''	115,0	7,03, (<i>d</i> , 2,1)	114,9	7,03 (<i>d</i> , 2,1)
3''	146,7	-	147,0	-
4''	149,4	-	149,8	-
5''	116,4	6,79 (<i>d</i> , 8,2)	116,5	6,78 (<i>d</i> , 8,2)
6''	123,0	6,98 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	123,0	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)
7''	147,4	7,59 (<i>d</i> , 15,9)	147,2	7,55 (<i>d</i> , 15,9)
8''	115,1	6,34 (<i>d</i> , 15,9)	115,1	6,22 (<i>d</i> , 15,9)
9''	168,6	-	168,2	-
OCH ₃	52,9	3,69 (<i>s</i>)	52,7	3,76 (<i>s</i>)

Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) para **M34**, **M36** e **M37**.

Posição	M34		M36		M37	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)
1	74,5	-	75,9	-	75,6	-
2a	35,8	2,32 (<i>dd</i> , 13,9; 3,8)	37,0	2,14 (<i>m</i>)	36,9	2,10 (<i>m</i>)
2b		2,17 (<i>dd</i> , 13,9; 7,2)		2,32 (<i>m</i>)		2,31 (<i>dd</i> , 14,5; 3,8)
3	72,4	5,39 (<i>m</i>)	67,0	5,31 (<i>m</i>)	69,9	5,63 (<i>m</i>)
4	70,6	3,98 (<i>dd</i> , 7,2; 3,3)	75,5	3,98 (<i>dd</i> , 6,5; 3,3)	75,8	5,05 (<i>dd</i> , 8,2; 2,3)
5	72,4	5,43 (<i>m</i>)	70,0	5,41 (<i>dd</i> , 8,0; 4,0)	66,2	4,30 (<i>m</i>)
6a	37,5	2,23 (<i>m</i>)	40,0	2,31 (<i>m</i>)	41,3	2,09 (<i>m</i>)
6b		2,22 (<i>m</i>)		2,18 (<i>m</i>)		2,18 (<i>m</i>)
7	177,2	-	176,2	-	176,1	-
1'	127,6	-	128,0	-	127,8	-
2'	115,1	7,07, (<i>d</i> , 2,0)	114,9	7,06 (<i>d</i> , 1,9)	115,1	7,03 (<i>d</i> , 1,9)
3'	146,5	-	146,8	-	146,5	-
4'	149,2	-	149,7	-	146,8	-
5'	116,4	6,79 (<i>d</i> , 8,3)	116,4	6,79 (<i>d</i> , 8,2)	149,2	6,76 (<i>d</i> , 8,2)
6'	122,8	6,97 (<i>dd</i> , 8,3; 2,0)	122,9	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	116,5	6,91 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)
7'	147,0	7,58 (<i>d</i> , 15,9)	147,2	7,62 (<i>d</i> , 15,9)	123,0	7,55 (<i>d</i> , 15,9)
8'	115,4	6,35 (<i>d</i> , 15,9)	114,8	6,34 (<i>d</i> , 15,9)	147,4	6,28 (<i>d</i> , 15,9)
9'	168,7	-	168,3	-	115,0	-
1''	127,9	-	128,0	-	168,4	-
2''	115,1	7,07, (<i>d</i> , 2,0)	114,8	7,07 (<i>d</i> , 1,8)	127,8	7,03 (<i>d</i> , 1,9)
3''	146,5	-	146,8	-	115,1	-
4''	149,5	-	149,7	-	146,8	-
5''	116,4	6,80 (<i>d</i> , 8,1)	116,4	6,78 (<i>d</i> , 8,2)	116,4	6,74 (<i>d</i> , 8,2)
6''	123,7	6,98 (<i>dd</i> , 8,1; 2,0)	123,0	6,96 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)	123,0	6,88 (<i>dd</i> , 8,2; 1,9)
7''	147,0	7,62 (<i>d</i> , 15,9)	147,3	7,55 (<i>d</i> , 15,9)	147,0	7,55 (<i>d</i> , 15,9)
8''	114,9	6,27 (<i>d</i> , 15,9)	114,8	6,22 (<i>d</i> , 15,9)	115,0	6,25 (<i>d</i> , 15,9)
9''	168,3	-	168,2	-	168,4	-

5.3. Perfil cromatográfico em CLAE

Considerando que algumas frações de *M. polymorphum* apresentam atividade biológica torna-se importante documentar o seu perfil cromatográfico (“fingerprint”) por CLAE. Essas análises permitem também identificar as substâncias em misturas, evitando o demorado trabalho de isolamento.

A primeira etapa dessas análises foi a realização de um gradiente linear exploratório para visualizar a complexidade das amostras, além de identificar a fase móvel mais eficiente para a separação dos componentes das frações **F1**, **F2**, e **F3** das cascas do tronco de *G. polymorpha*.

Para obtenção do cromatograma (*fingerprint*) das frações, foi utilizado o método do gradiente exploratório linear (SNYDER & DOLAN, 1996; SNYDER *et al.*, 1997), utilizando duas condições: H₂O e ACN, variando a concentração do modificador orgânico ACN de 5-100% em 60 minutos (Método 1, p. 25); e H₂O/TFA 0,05% e MeOH, variando a concentração do modificador orgânico MeOH de 5-100% em 60 minutos (Método 2, p. 25). O gradiente linear exploratório utiliza a eluição gradiente em condições de ampla faixa de força da fase móvel e é muito útil para fornecer o perfil cromatográfico de um extrato vegetal, comumente referido como “impressão digital” do extrato (*fingerprint*).

A análise dos perfis obtidos permitiu verificar que a fração em CH₂Cl₂ (**F1**) (Figura 118, p. 106) apresenta menor complexidade e, como esperado, constituintes menos polares que as frações em AcOEt (**F2**) (Figura 121, p. 109) e BuOH (**F3**) (Figura 122, p. 109). É interessante ressaltar que, a maioria dos constituintes da fração **F1** absorvem mais em comprimentos de onda menores (254 nm) e, no caso das frações **F2** e **F3**, a maioria dos constituintes absorvem mais em comprimentos de onda maiores (325 nm). Isto pode ser atribuído às diferenças estruturais nos compostos presentes em cada fração. Apesar de termos encontrado constituintes comuns às duas frações, **F2** e **F3** apresentam constituintes mais polares do que **F1**.

A troca do modificador orgânico, de MeOH por ACN, permite uma melhor resolução do perfil cromatográfico para a fração **F1**. De acordo com SNYDER & DOLAN, a mistura ACN-H₂O como fase móvel é menos viscosa e permite que as análises sejam feitas em valores de pressão mais baixas, além da utilização de valores de comprimento de onda menores no UV, para detecção de compostos. Assim, o melhor perfil para esta fração foi observado no método 3 (p. 28), em 254 nm ou 212 nm.

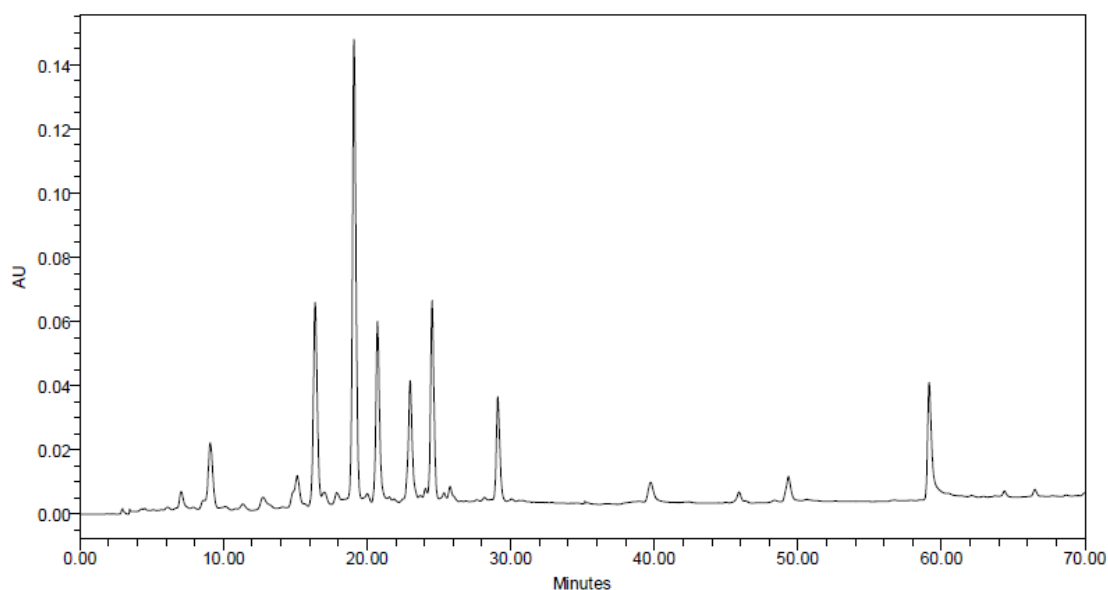


Figura 113 – Cromatograma analítico de **F1** (método 3, p. 28), em 254 nm.

Depois de avaliados os perfis cromatográficos das frações, procedeu-se o isolamento dos constituintes por CLAE, através da utilização de coluna semi-preparativa. Para a realização deste trabalho, as condições cromatográficas estabelecidas para a separação em coluna analítica foram escalonadas. O escalonamento tem por finalidade os ajustes dos parâmetros cromatográficos (diâmetro e comprimento de coluna, fase estacionária empregada, dimensões das partículas da fase estacionária, vazão da fase móvel) de forma a conseguir reproduzir em escala preparativa ou semi-preparativa os resultados obtidos em escala analítica.

A partir do perfil cromatográfico da fração **F1**, foram realizadas também as análises das lactonas sesquiterpênicas **M16**, **M17**, **M18** e **M19**, **M21**, **M22**, **M23** e **M24**, no método 3 (Figuras 114, 116 e 117, p. 104 - 105). Estas substâncias absorvem em comprimentos de onda abaixo de 210 nm. Por esta razão, a identificação das substâncias no cromatograma da fração bruta **F1** (figura 118, p. 106) foi feita por comparação dos tempos de retenção das substâncias puras e seus espectros de UV. Os picos em aproximadamente 50 e 60 min. são referentes a impurezas no solvente acetonitrila.

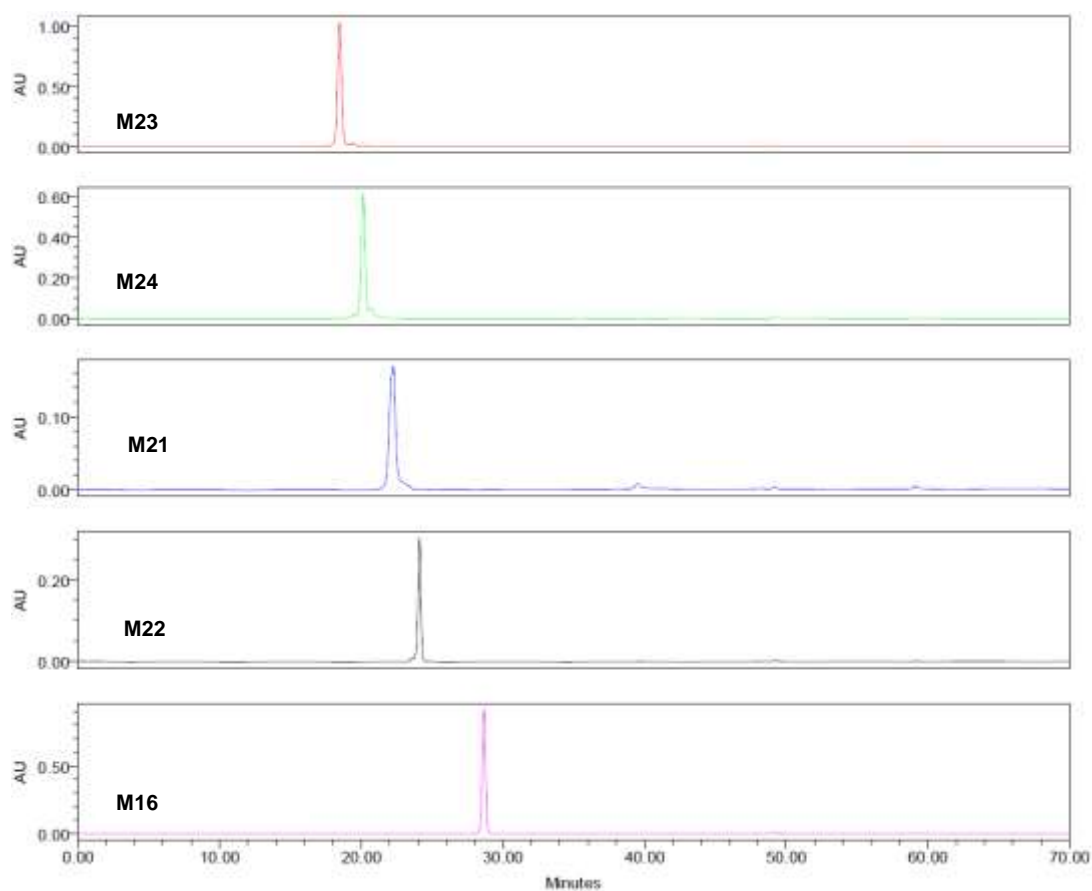


Figura 114 – Cromatogramas das lactonas diméricas (**M16**, **M21** - **M24**) das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (método 3, p. 28), em 254 nm.

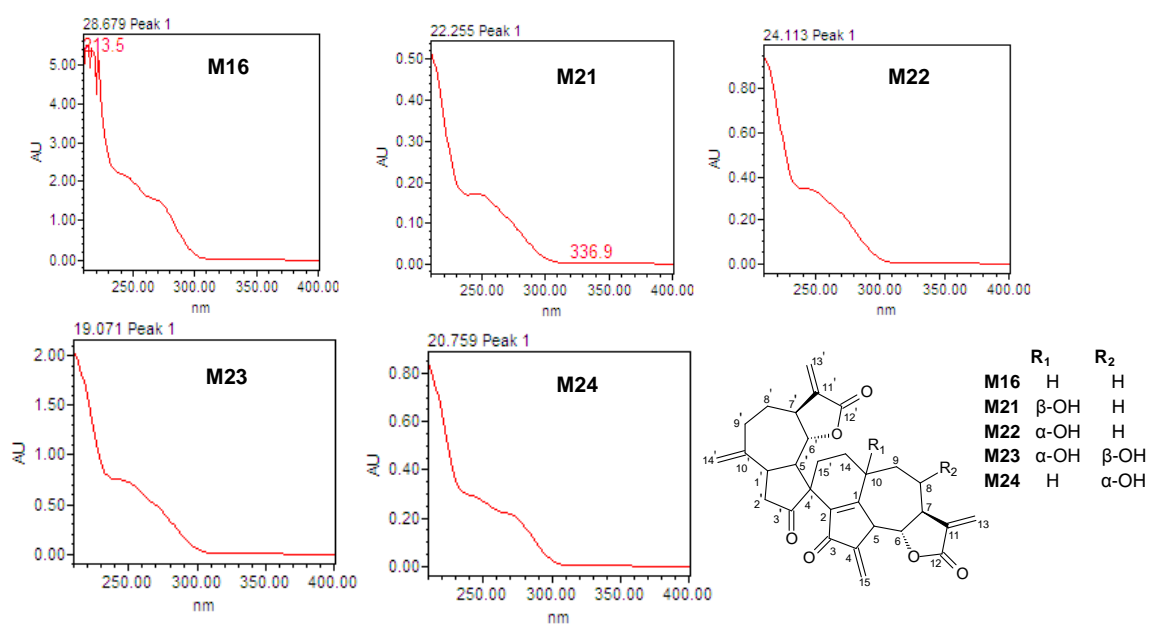


Figura 115 – Espectros de UV das lactonas diméricas (**M16**, **M21** - **M24**).

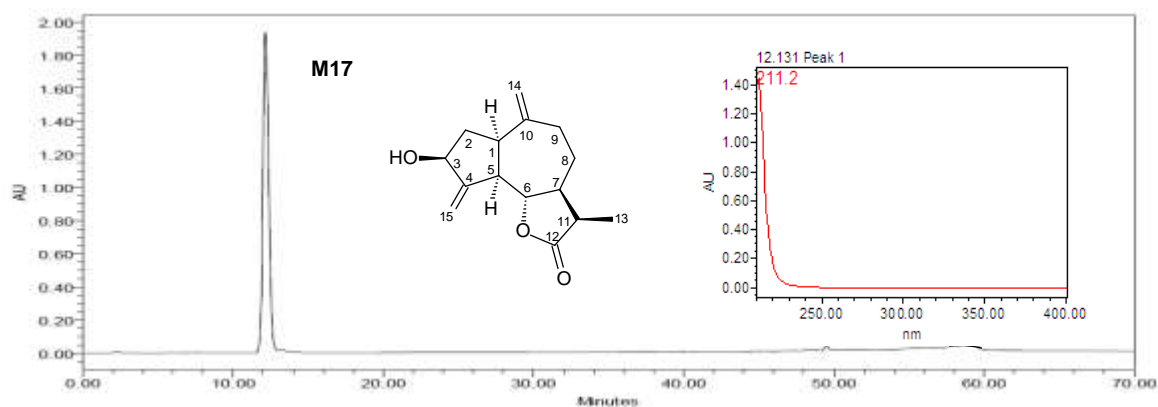


Figura 116 – Cromatograma em 212 nm e espectro de UV da lactona sesquiterpênica **M17** das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (método 3, p. 28).

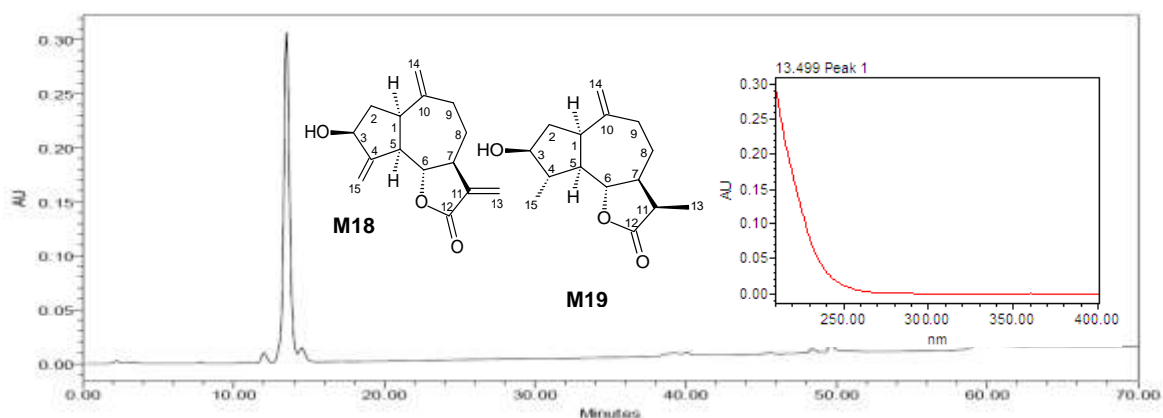


Figura 117 – Cromatograma em 212 nm e espectro de UV da mistura de lactonas sesquiterpênicas **M18+M19** das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (método 3, p. 28).

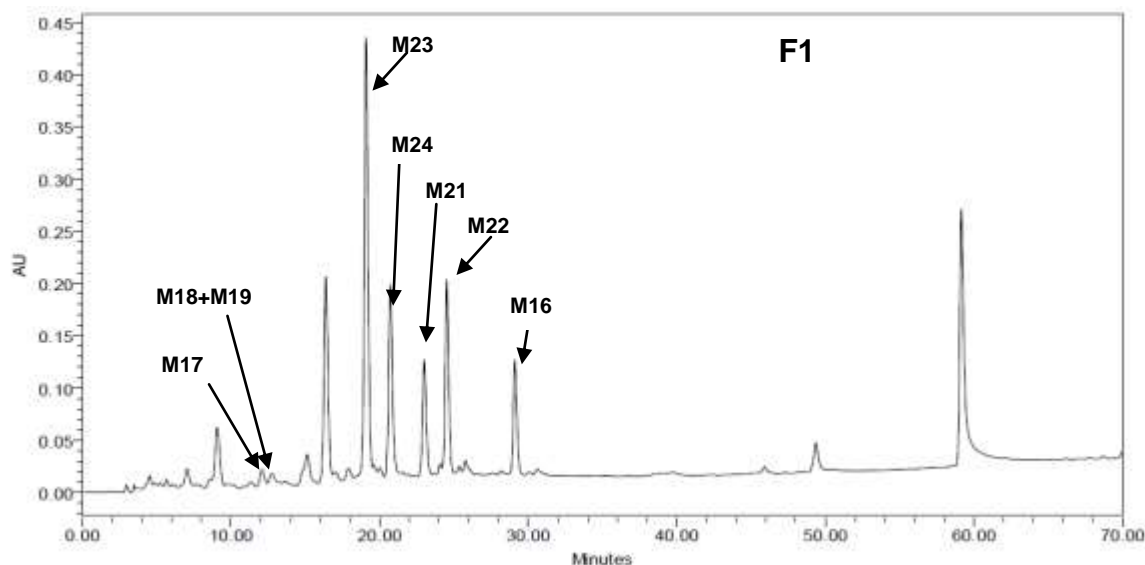


Figura 118 – Perfil analítico de **F1** (CH_2Cl_2) (método 3, p. 28) em 212 nm, com a identificação dos constituintes isolados.

Foram obtidos também os perfis cromatográficos das frações em CH_2Cl_2 das folhas e das flores de *M. polymorphum* a fim de compararmos com o perfil das cascas do tronco (Figura 119, p. 107). Como podemos observar, estas frações se mostraram diferentes. Cascas e folhas têm alguns constituintes em comum, mas as flores são completamente diferentes, confirmando o estudo fitoquímico realizado. Essas diferenças de composição entre as partes da planta certamente influem na atividade biológica e poderiam explicar as diferenças de resultados obtidos para extratos de folhas e cascas, relatados em estudos anteriores (MOREIRA *et al.*, 2000; STEFANELLO *et al.*, 2006^b; PIORNEDO *et al.*, 2011).

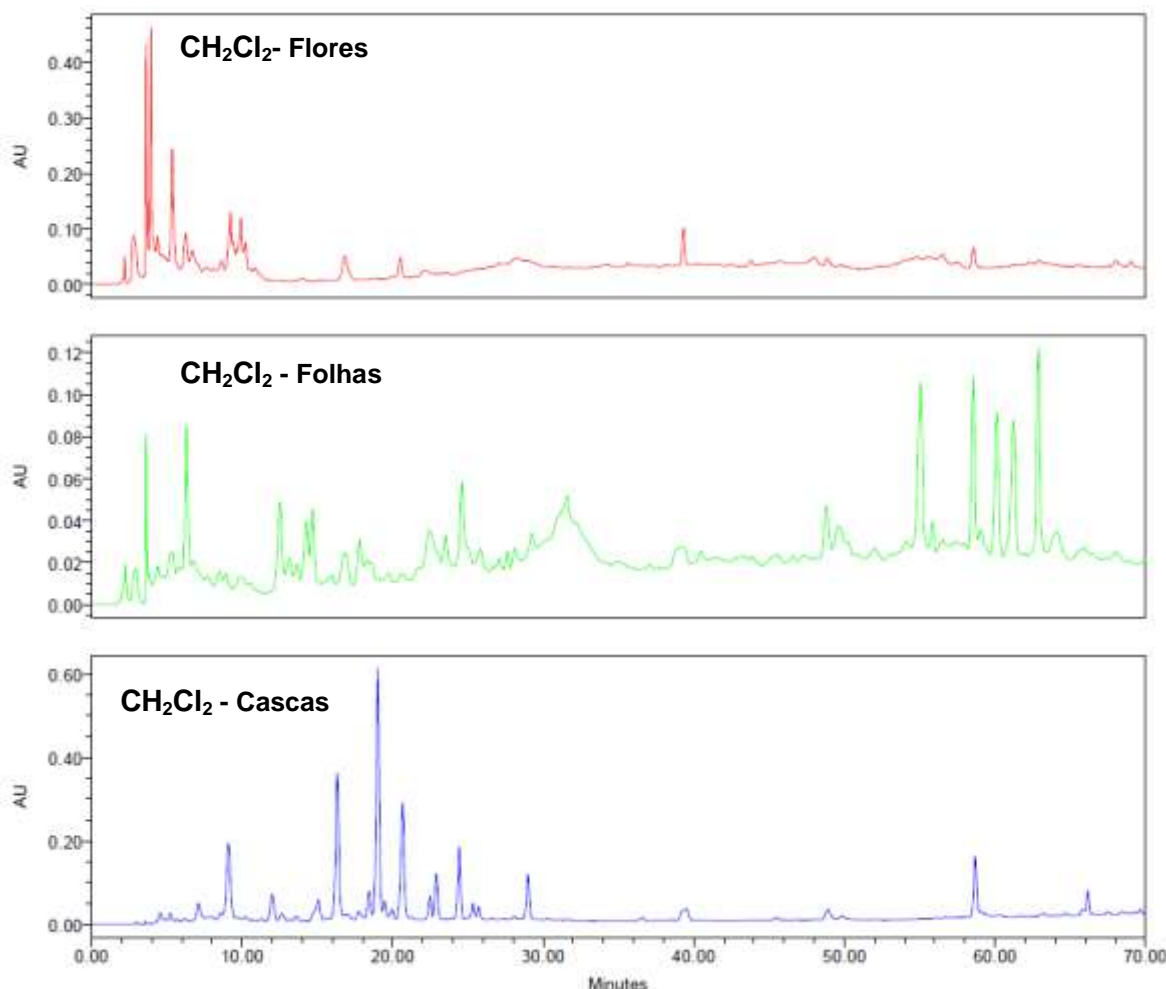


Figura 119 – Comparação dos perfis cromatográficos das frações em CH_2Cl_2 das cascas, das flores e das folhas de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (método 3, p.28), em 254 nm.

As frações mais polares de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*, **F1C** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$), **F1D** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$), **F2** (AcOEt), **F2A** ($\text{AcOEt}/\text{AcOEt}$), **F2B** (AcOEt/MeOH) e **F3** (BuOH), também foram analisadas no CLAE para obtenção de seus perfis cromatográficos (figuras 120, p. 108), utilizando o método 2 (p. 27).

Os constituintes isolados da fração **F2** (AcOEt) foram analisados no mesmo método, o que permitiu a identificação dos picos, através da comparação com os tempos de retenção. Podemos observar que a fração **F2** (AcOEt) se mostrou mais complexa que a fração **F3** (BuOH), porém estas frações apresentam muitos constituintes em comum.

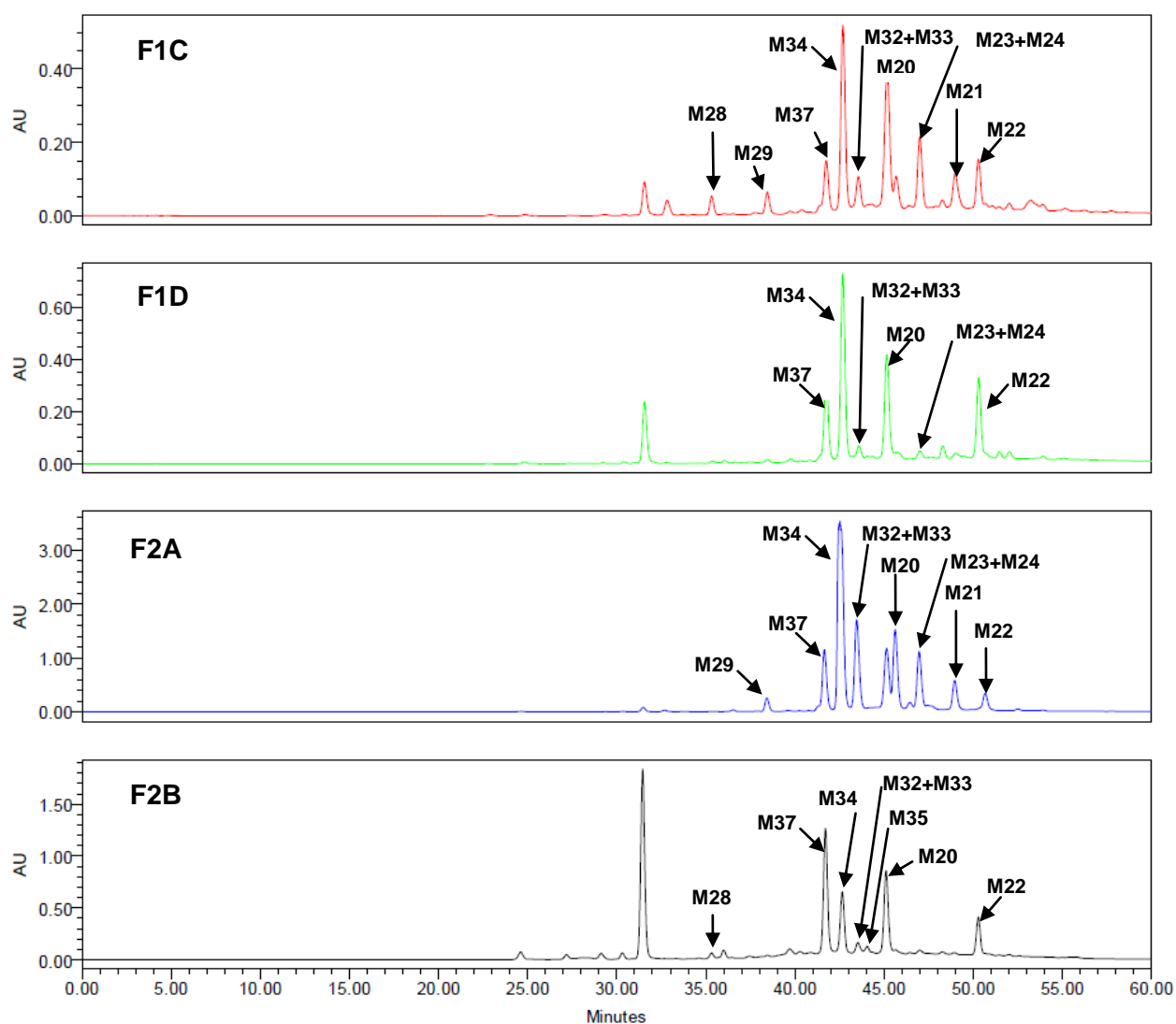


Figura 120 – Cromatogramas analíticos de **F1C**, **F1D**, **F2A** e **F2B** (método 2, p. 27), em 325 nm.

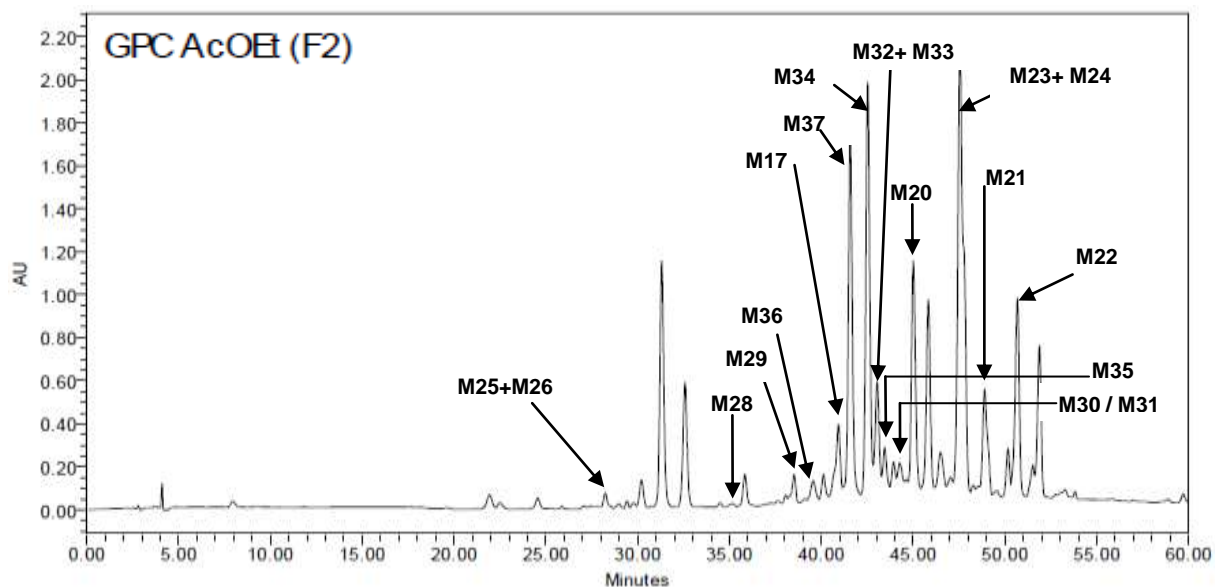


Figura 121 – Cromatograma analítico de **F2** (método 2, p. 27), em 325 nm.

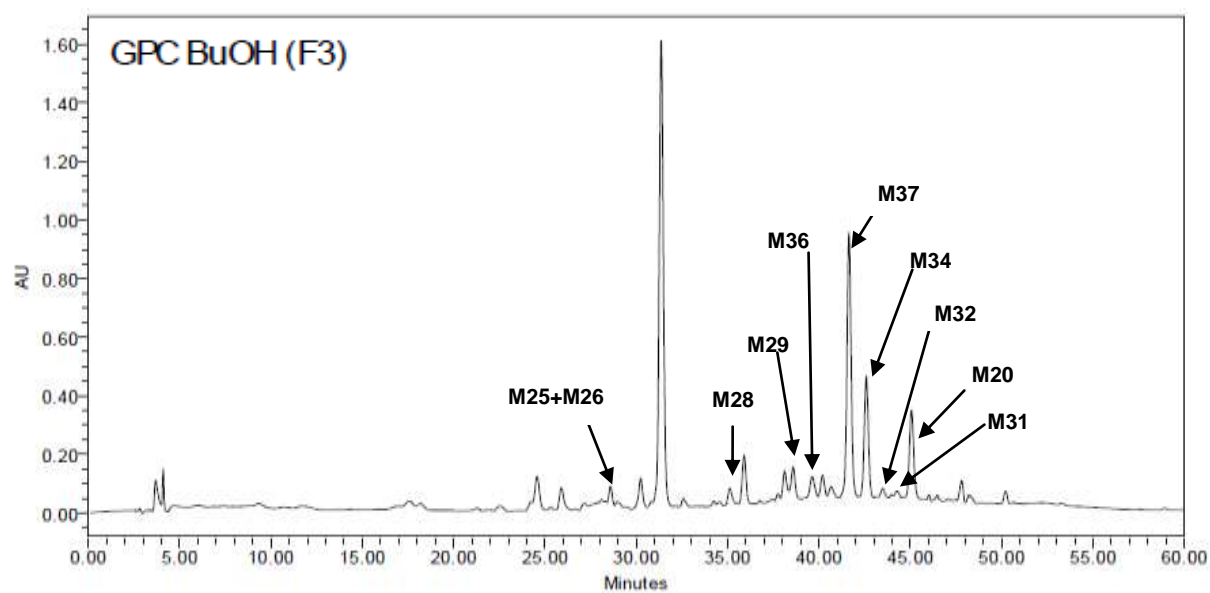


Figura 122 – Cromatograma analítico de **F3** (método 2, p. 27), em 325 nm.

5.4. Atividade citotóxica

Inicialmente, foram avaliados os dois extratos brutos das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* (EH e EtOH), mas somente o extrato em EtOH mostrou alguma atividade (Tabela 21, p. 112). Este extrato foi ativo contra células de melanoma e rim com TGI < 83,3 µg/mL, enquanto que EH mostrou TGI > 250 µg/mL para todas as linhagens testadas. Além disso, o extrato etanólico não mostrou efeitos citotóxicos contra as células normais (VERO), confirmando o resultado anterior obtido no ensaio de toxicidade contra *Artemia salina* (STEFANELLO *et al.*, 2006^b).

Com base neste resultado, foram testadas as frações obtidas por partição do extrato etanólico das cascas do tronco (**F1**, **F2** e **F3**). Como pode ser observado na tabela 21 (p. 112), a maior atividade foi da fração **F1**, que mostrou atividade citotóxica contra todas as linhagens de células testadas, com TGI variando de 0,25 - 68,17 µg.mL⁻¹. Por outro lado, a fração **F2** foi ativa contra a linhagem OVCAR-3 (TGI 12,94 µg.mL⁻¹), enquanto que **F3** foi ativa contra a linhagem 786,0 (TGI 67,57 µg.mL⁻¹).

Portanto os constituintes ativos estavam, em sua maioria, na fração de polaridade média obtida com diclorometano. Um novo ensaio foi realizado, desta vez com a fração em diclorometano obtida por fracionamento cromatográfico (**F1B**). Esta fração foi ainda mais ativa que **F1**, mostrando que continha os constituintes ativos em maior concentração. Foram então ensaiadas as principais substâncias obtidas desta fração.

O triterpeno acetato de bauerenila (**58**) foi considerado inativo, pois apresentou TGI > 83,3 µg/mL para todas as linhagens de células testadas.

Para as substâncias puras testadas foi calculado o TGI em µmol.L⁻¹ (Tabela 22, p. 113) para uma melhor comparação de potência. A lactona 11αH-13-diidrozaluzanin C (**M17**) mostrou uma atividade fraca contra a linhagem UACC62 (melanoma) (TGI 205,72 µmol.L⁻¹), sendo também citotóxica contra a linhagem VERO (TGI 168,6 µmol.L⁻¹). Uma vez que a atividade antitumoral de lactonas sesquiterpênicas está relacionada à presença de um anel lactônico com uma ligação dupla exocíclica (ZHANG *et al.*, 2005; MERFORT, 2011; CHADWICK *et al.*, 2013), esse resultado é coerente com a estrutura de **M17**, que não possui essa ligação dupla.

Por outro lado, as lactonas diméricas possuem dois anéis lactônicos com ligações duplas exocíclicas e, portanto, espera-se que apresentem uma boa atividade. Isso realmente foi observado. As lactonas diméricas **M16**, **M22-M24** mostraram atividade antitumoral contra todas as linhagens de células, com exceção de leucemia (K562) (Tabela 22, p. 113). Os resultados mais promissores foram obtidos com 10-desoxigochnatiolídeo A (gochnatiolido C) (**M16**) e gochnatiolídeo A (**M22**). Estas substâncias foram bastante ativas contra células tumorais, mas foram pouco tóxicas em

relação às células normais. Em particular, **M22** mostrou grande atividade contra células NCI-ADR/RES com TGI de $1,39 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo mais ativo do que o padrão de doxorubicina (Figura 123, p. 111) (TGI $7,80 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e cerca de 10 vezes menos tóxica.

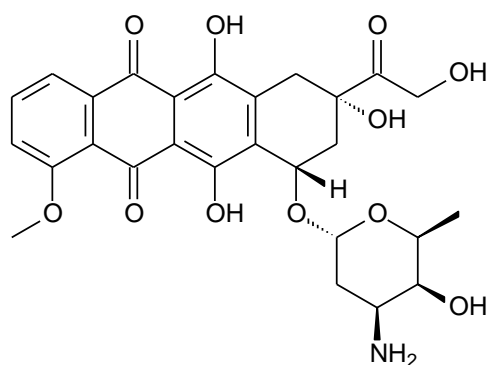


Figura 123 – Estrutura da doxorubicina.

Tabela 21 – Atividade citotóxica de extratos e substâncias isoladas das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*^a

Linhagem de células	TGI (µg/mL)*										
	EtOH	F1	F2	F3	F1B	M17	M16	M22	M23	M24	Doxorubicina
U251	>250	11,1	-	-	9,70	>83,3	1,43	1,09	2,39	1,98	0,12
UACC-62	82,77	0,25	122,3	196,3	0,25	51,08	0,41	0,49	0,76	0,49	0,14
MCF-7	146,0	4,22	177,6	>250	3,44	>83,3	3,22	1,69	9,1	38,25	0,37
NCI-ADR/RES	>250	2,93	>250	>250	3,24	>83,3	2,58	0,70	7,97	4,11	4,24
786.0	63,13	-	88,10	67,57	-	>83,3	0,21	0,42	2,45	1,78	0,02
NCI-H460	>250	68,17	>250	>250	29,17	>83,3	>50	4,66	35,06	3,30	0,44
PC-3	>250	9,35	>250	>250	2,73	>83,3	-	6,63	5,36	25,03	0,35
OVCAR-3	123,57	10,22	12,94	>250	6,02	>83,3	9,94	13,13	110,23	114,89	1,24
HT-29	>250	15,75	250	>250	10,5	>83,3	3,52	5,42	80,67	19,13	0,06
K562	-	1,88	>250	>250	1,38	>83,3	>50	114,87	125,81	96,38	0,25
VERO	250	-	-	-	-	41,88	>50	54,73	7,90	19,42	6,38

- não testada; * TGI – Total Growth Inhibition – concentração necessária para inibir em 100% o crescimento celular em µg/mL. Os coeficientes de variação obtidos nestas análises ficaram abaixo de 5%; U251: glioma; UACC-62: melanoma; MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário resistentes a múltiplos fármacos; 786.0: rim; NCI-H460: pulmão, células não pequenas; PC-3: próstata; OVCAR-3: ovário; HT-29: colon; K562: leucemia; VERO: células normais de rim de macaco verde.

^a EtOH: extrato etanólico bruto; **F1**, **F2** and **F3**: frações de EtOH obtidas por partição com CH₂Cl₂, AcOEt e 1-butanol, respectivamente; **F1B**: fração obtida de F1 por VLC eluída com CH₂Cl₂; **M17**: 11αH,13-diidroazulazanin C; **M16**: 10-desoxigochnatiolideo A; **M22**: gochnatiolideo A; **M23**: 8-hidroxigochnatiolideo A; **M24**: 8-hidroxi-10-desoxigochnatiolideo A.

Tabela 22 – Atividade citotóxica (TGI em $\mu\text{mol.L}^{-1}$) das substâncias isoladas **M17**, **M16**, **M22**, **M23**,e **M24**.

Linhagem de células	TGI ($\mu\text{mol L}^{-1}$)					Doxorubicina
	M17	M16	M22	M23	M24	
U251	>335	2,94	2,16	4,61	3,95	0,22
UACC-62	205,72	0,84	0,97	1,46	0,97	0,25
MCF-7	>335	6,62	3,36	17,54	76,10	0,68
NCI-ADR/RES	>335	5,30	1,39	15,47	8,27	7,80
786.0	>335	0,43	0,83	4,73	3,56	0,04
NCI-H460	>335	>103	9,32	67,68	6,64	0,81
PC-3	>335	-	13,21	10,34	49,89	0,64
OVCAR-3	>335	20,40	26,10	212,60	228,61	2,28
HT-29	>335	7,20	10,84	155,62	38,13	0,11
K562	>335	>103	228,63	242,69	185,89	0,46
VERO	168,6	>103	108,95	15,25	38,63	11,7

5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Até o momento, foram testados o extrato etanólico (EtOH) e as frações obtidas por partição (**F1**, **F2** e **F3**) deste extrato das cascas do tronco de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*. Os resultados da atividade antioxidante e do teor de fenóis totais estão nas tabelas 23-25 (p. 115 - 116).

A fração **F2** (AcOEt) foi a mais ativa em todos os ensaios, apresentando uma atividade antioxidante maior do que os controles positivos. As demais amostras também foram ativas, e a atividade variou conforme o teste. No ensaio DPPH (Tabela 23, p. 115) a fração em diclorometano (**F1**) também apresentou elevada capacidade antioxidante (maior do que a quercetina), vindo a seguir a fração butanólica (**F3**) e por último o extrato etanólico (**EtOH**). Essa sequência mostrou uma correlação direta com o conteúdo fenólico determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Tabela 24, p. 116).

No entanto, no ensaio ORAC, a segunda amostra mais ativa foi a fração butanólica (**F3**), seguida do extrato etanólico e, finalmente da fração em diclorometano (**F1**). Essa diferença pode ser explicada pelos mecanismos envolvidos em cada ensaio.

Os ensaios antioxidantes podem ser classificados em duas categorias: ensaios nos quais há transferência de hidrogênio, geralmente baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos, como o ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*), e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos, tais como o teste DPPH e o ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (FCR) (HUANG *et al.*, 2005; ROGINSKY & LISSI, 2005).

No ensaio ORAC é utilizado um radical AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (Figura 125, p. 117) e fluoresceína (Figura 126, p. 117), que é a substância cuja fluorescência será medida. Neste ensaio o radical peroxila, gerado pela reação do AAPH com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria, com máxima emissão de fluorescência em 528 nm. Há transferência de hidrogênio no mecanismo de inibição do processo oxidativo, de modo que é medida a capacidade do antioxidante presente na amostra em seqüestrar radicais peroxila gerados pelo radical AAPH, em um estudo de cinética química. Portanto, amostras com hidrogênios ácidos, como os fenóis, reagem rapidamente, levando a uma maior atividade antioxidante. As análises por CLAE mostraram que substâncias fenólicas estavam presentes em todas as amostras, mas variavam na composição. Provavelmente as frações **F2** e **F3** concentraram os ácidos livres (**M34**, **M36** e **M37**) que, sendo mais ácidos do que os seus respectivos ésteres, reagem mais rapidamente neste ensaio.

O DPPH e o FCR são ensaios indiretos, colorimétricos, menos sensíveis, mediados pela transferência de elétrons, sendo tipicamente uma reação de oxi-redução, entre o oxidante, que é o reagente de Folin-Ciocalteu, e o redutor, que é a amostra. O reagente de Folin-Ciocalteu sofre mudanças colorimétricas que são quantificáveis. É medida a capacidade redutora da amostra rica em fenóis solúveis totais, onde os fenóis presentes na amostra são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação de O^{2-} , que reage com os ácidos fosfotungístico e fosfomolibdico, formando compostos com intensa absorção em 750 nm. No ensaio DPPH, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila - figura 124, p. 117), que é estável e de coloração púrpura, torna-se amarelo ao ser reduzido. Sendo uma reação de oxi-redução, qualquer substância redutora presente na amostra contribui para o resultado final. Aqui provavelmente, não havia diferença no poder redutor das várias substâncias fenólicas presentes nas diferentes amostras, de modo que o fator determinante foi o conteúdo fenólico total.

A atividade antioxidante de substâncias fenólicas é muito conhecida e já foi extensivamente estudada (CHALAS *et al.* 2001; ALVES *et al.* 2010). Portanto, não há interesse em testar os derivados do ácido cafeico isolados neste trabalho. Resta avaliar se alguma das lactonas presentes nas frações **F1** e **F2** poderia atuar como agente redutor no ensaio DPPH, contribuindo para a atividade antioxidante total. Esse ensaio será realizado em breve.

Tabela 23: Valores de concentração inibitória (IC_{50}) para o extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* frente ao ensaio DPPH.

Amostras	IC_{50} ($\mu g/mL$)
EtOH	$23,0 \pm 5,7$
F1	$7,6 \pm 1,7$
F2	$1,3 \pm 1,6$
F3	$13,5 \pm 3,2$
Quercetina *	$13,1 \pm 1,8$
Trolox *	$2,2 \pm 1,2$

Dados expressos como média \pm desvio padrão do ensaio em triplicata; IC_{50} = Concentração que reduz em 50% o radical DPPH. * Controles positivos.

Tabela 24: Conteúdo de fenóis totais do extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum*.

Amostras	Conteúdo fenólico (mg de AGE/Kg de extrato ou fração)
EtOH	3,00 ± 0,06
F1	4,00 ± 0,03
F2	4,90 ± 0,04
F3	3,50 ± 0,06

Dados apresentados como média ± desvio padrão do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como miligramas de ácido gálico equivalente por quilograma de extrato ou fração em base seca.

Tabela 25: Capacidade antioxidante para o extrato e frações obtidos de *M. polymorphum* subsp. *floccosum* frente ao ensaio ORAC.

Amostras	Ensaio ORAC (µmol de TE/g de extrato ou fração)
EtOH	1112 ± 260
F1	555 ± 14
F2	1983 ± 6
F3	1938 ± 240

Dados apresentados como média ± desvio padrão do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como µmol de Trolox equivalente por grama de extrato ou fração em base seca.

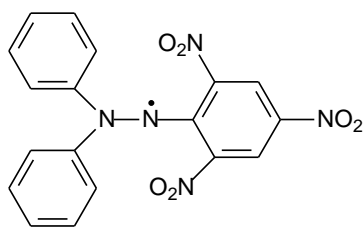


Figura 124 – Estrutura do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila).

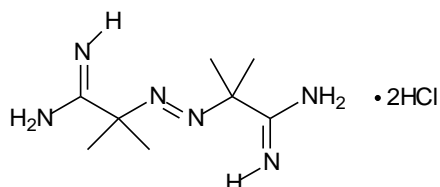


Figura 125 – Estrutura do AAPH (2,2'-Azobis-(2-amidinopropano)).

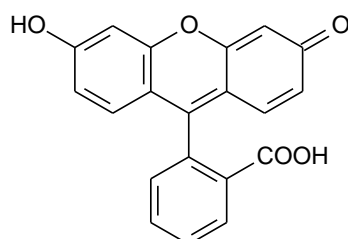


Figura 126 – Estrutura da Fluoresceína

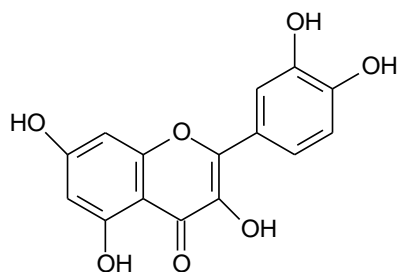


Figura 127 – Estrutura da quercetina.

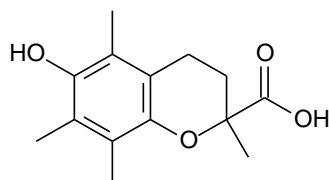


Figura 128 – Estrutura do Trolox.

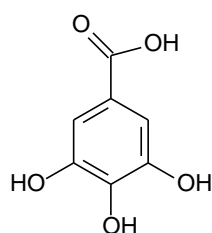


Figura 129 – Estrutura do ácido gálico.

6. CONCLUSÃO

Vários estudos foram conduzidos anteriormente com *M. polymorphum*, mas a maioria ficou restrita aos extratos menos polares de cascas, folhas ou partes aéreas. O presente estudo fitoquímico investigou pela primeira vez os constituintes das flores, além das frações mais polares das cascas do tronco. Como resultado, foram identificadas 37 substâncias, incluindo triterpenos, lactonas sesquiterpênicas e derivados do ácido cafeico. Destas, duas são novos guaianolídeos, enquanto que 25 estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie ou no gênero.

Lactonas sesquiterpênicas são conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas, sendo a mais notável a atividade antitumoral. Apesar desse conhecimento ser antigo e, de vários guaianolídeos terem sido isolados no passado a partir de *Moquiniastrium polymorphum*, nenhum teste de atividade anticancer tinha sido realizado com a planta ou suas substâncias. Agora, através de um estudo químico guiado por ensaios de atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais humanas, foi descoberto que gochnatiolídeo A, um guaianolídeo dimérico, apresenta significativa atividade antitumoral *in vitro*. Esse resultado será a base para estudos *in vivo* da atividade antitumoral de *M. polymorphum*.

A ocorrência de ácidos dicafeoilquínicos e seus ésteres nas cascas do tronco confere aos extratos e frações de *M. polymorphum* considerável atividade antioxidante, que provavelmente está relacionada com os efeitos anti-inflamatórios observados em estudos anteriores, principalmente na fração butanólica que é rica nesses constituintes.

Também foi verificado, tanto por perfil analítico em CLAE como por fracionamento, que as flores acumulam metabólitos muito diversos daqueles encontrados nas cascas e folhas. Enquanto as frações menos polares das cascas e folhas contém guaianolídeos, as flores contém triterpenos. Esse é um dado muito interessante porque a população usa indistintamente cascas, folhas ou flores para a preparação de chás ou xaropes contra doenças inflamatórias. Em estudos anteriores, a atividade anti-inflamatória foi atribuída à presença de lactonas sesquiterpênicas e substâncias fenólicas, respectivamente nas cascas e folhas, mas estas substâncias estão ausentes em quantidades detectáveis nas flores. Pode ser que o chá das flores seja ineficaz ou que outra classe de substâncias esteja atuando como anti-inflamatório. Esse resultado aponta para a necessidade de um estudo químico mais profundo das flores, acompanhado de um estudo farmacológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; MARUMO, S. Identification of auxin-active substance as ethyl chlorogenate and indole-3-acetic acid in immature seeds of *Helianthus annuus*. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 42, 1972.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Allured Publ. Corp.*, Carol Stream, IL, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, **33**, 2202-2210, 2010.
- ARAMBARRI, A. M.; FREIRE, S. E.; COLARES, M. N.; BAYON, N.D.; NOVOA, M.C.; MONTI, C.; STENGLEIN, S. A. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from misiones Forest of the Paranaense province (Argentina). *Part 2. Bol. Soc. Argent. Bot.*, **43**, 31-60, 2008.
- ARAVINDARAM, K.; YANG, N-S. Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. *Planta Med.*, **76**, 1103-1117, 2010.
- BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G.; BERNARDI, M. M. Toxicity of apolar and polar *Lantana camara* L. crude extracts in mice. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 106-115, 2011.
- BOHLMANN, F.; AHMED, M.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Dimeric sesquiterpene lactones and kolavane derivatives from *Gochnatia paniculata*. *Phytochemistry*, **22**, 191-195, 1983.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Five germacranolides from *Gochnatia discoidea*. *Phytochemistry*, **20**, 109-112, 1981.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Neue germacranolide und andere inhaltsstoffe aus vertretern der subtribus gochnatiinae. *Phytochemistry*, **18**, 95-98, 1979.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JAKUPOVIC, J.; DOMINGUEZ, X. A.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Dimeric guaionolides and other constituents from *Gochnatia* species. *Phytochemistry*, **25** (5), 1175-1178, 1986.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, **111**, 396-402, 2007.
- BUSKÜHL, H. *Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vernonia scorpioides (Lam) Pers.* Dissertação de mestrado, Universidade do Vale do Itajaí, 2007.
- BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; COSTA, R. B.; POTT, A.; POTT, V. J.; SHCEIDT, G. N.; BATISTA, M. S. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani

indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Bot. Bras.*, **19**, 39-44, 2005.

CABRERA, L. A. & KLEIN, R.M. *Compostas – tribo Mutisieae*, in Reitz, R. *Flora Illustrada Catarinense*, Ed. Por Raulino Reitz, 1-124, 1973.

CATALAN, C. A. N.; VEGA, M. I.; LOPEZ, M. E.; CUENCA, M. R.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. Coumarins and a kaurane from *Gochnatia polymorpha* ssp. *polymorpha* from Paraguay. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 417-22, 2003.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 12780-12805, 2013.

CHALAS, J.; CLAISE, C.; EDEAS, M.; MESSAOUDI, C.; VERGNES, L.; ABELLA, A.; LINDENBAUM, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, [S.I.], **55**, 54-60, 2001.

CHIANG, Y. M.; LO, C. P.; CHEN, Y. P.; WANG, S. P.; YANG, N. S.; KUO, Y. H.; SHYUR, L. F. Ethyl caffeate suppresses NF- κ B activation and its downstream inflammatory mediators, INOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. *Brit. J. Pharmac.*, [S.I.], **146**, 352-363, 2005.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; SILVA, E. P.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapira guianensis*. *Quim. Nova*, **31**, 2056-2059, 2008.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Irinoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta*, **80**, 1144-1152, 1997.

DAVID, N.; MAURO, M. O.; GONÇALVES, C. A.; PESARINI, J. R.; STRAPASSON, R. L. B.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E. A.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; OLIVEIRA, R. J. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.*, **154**, 370-379, 2014.

DEBNATH, T.; KIM, H. D.; LIM, B. O. Natural products as source of anti-inflammatory agents associated with inflammatory bowel disease. *Molecules*, **18**, 7253-7270, 2013.

DIAZ, G.; NOGUEIRA, M. A.; OLGUIN, C. F. A.; SOMENSI, A.; VIDOTTI, G. J. Estudo fitoquímico e biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). *Latin. Am. J. Pharm.*, **27**, 56-61, 2008.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. O.; BAITELLO, J. B. Sementes e mudas de árvores tropicais. L^a ed., São Paulo: Instituto Florestal, 65, 2002.

FARIAS, A. C. M.; DA SILVA, J. R.; TOMASSINI, T. C. B. Constituents of *Mochinea polymorpha*. *J. Nat. Prod.*, **47**, 363-364, 1984.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, São Luís, **18**, 2011.

FLORA DO BRASIL, Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>, acesso em 07/07/2014.

GARCIA, E. E.; GUERREIRO, E. Sesquiterpene lactones from *Gochnatia palosanto* and coumarins from *G. argentina*. *Phytochemistry*, **27**, 288-290, 1988.

GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **4**, 9-18, 2001.

GHIRINGHELLI, F.; APETOH, L. The interplay between the immune system and chemotherapy: emerging methods for optimizing therapy. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **10**, p. 19-30, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, [S.l.], **27**, 1-93, 2006.

HARBONE, J.B. *Phytochemical Methods. A guide to Modern Technique of Plant Analysis*, 3th ed., Chapman & Hal, London, 1998.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of the oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 1815-1821, 2002.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em www.inca.gov.br, acesso em 20 de junho de 2014.

KATINAS, L.; PRUSKI, J.; SANCHO, G.; TELLERIA, M. C. The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). *Bot. Rev.*, **74**, 551-559, 2008.

KIM, H. J.; JIN, C.; LEE, Y. S. Isolation and antioxidative activities of caffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glycosides from leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *J. Appl. Pharmacol.*, **15**, 46-51, 2007.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food bioprod. Process.*, **89**, 217-233, 2011.

KUMARI, G. N. K.; MSILAMANI, S.; GANESH, M. R.; ARAVIND, S. Microbial transformation of zaluzanin-D. *Phytochemistry*, **62**, 1101-1104, 2003.

LEE, E. J.; KIM, J. S.; KIM, H. P.; LEE, J.; KANG, S. S. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chem.* **120**, 134-139, 2010.

LI, X.; LIU, J.; CAI, J. e CAI, P. Complete ^1H and ^{13}C data assignments of two new guainolides isolated from *Ainsliaea fragrans*. *Magn. Reson. Chem.* **46**, 1070-1073, 2008.

LIMA, M. C. L.; LEMOS, T. L. G.; FILHO, R. B.; PESSOA, O. D. L. Chemical constituents from the flowers of *Gochnatia blanchetiana* (DC) Cabrera. *Rev. Latinoamer. Quim.*, **31**, 85-88, 2003.

LIMA, S. R.; OLIVEIRA, G. S.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia – *Moquinia polymorpha* (Less) DC. *Ciencia Florestal* (Santa Maria), **17**, 145-155, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LUCARINI, R.; SALLOUM, A. I. O.; REZENDE, K. C. S.; ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; MAGALHÃES, L. G.; E SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; VINHOLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G. Antileishmanicidal activity of *Gochnatia pulchra*. *Planta Med.*, **11**, 2012.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. *Série A - Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica*, Brasília -DF, **31**, 2012.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575, 1994.

MATHEMA, V. B.; KOH, Y.; THAKURI, B. C.; SILLANPÄÄ, M. Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities. *Inflammation*, **35**, 560-565, 2012.

MATTOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141, 1997.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P. DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Quim. Nova*, **22**, 185-188, 1999.

MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. *Current Drug Targets*, **12**, 1560-1573, 2011.

MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, E. F.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenóides pentacíclicos de *Mentha villosa*: identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Quim. Nova*, **24**, 491-500, 2001.

MOREIRA, A. S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SCHENKEL, E. P. Anti-inflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytother. Res.*, **14**, 638-640, 2000.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*, Michigan: Reference Publications Inc., p. 60, 2000.

OLEA, R.S.G., ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . *Quim. Nova*, **13**, 278-281, 1990.

OLIVEIRA, F. L. *Análise Fitoquímica de Hedyosmum brasiliense* Miq. (*Chloranthaceae*). Dissertação de mestrado, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2009.

PANERO, J.L.; FUNK, V.A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **47**, 757–782, 2008.

PICCINELLI, A.L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5863-5868, 2004.

PIORNEDO, R. R.; SOUZA, P.; STEFANELLO, M. E. A.; STRAPASSON, R. L. B.; ZAMPRONIO, A. R.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *J. Ethnopharmacol.*, **133**, 1077-1084, 2011.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273-3279, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-613, 2001.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, **92**, 235-254, 2005.

SACILOTTO, A. C. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Ent-kaurene diterpenes from *Gochnatia polymorpha* var. *polymorpha*. *Phytochemistry*, **44**, 659-661, 1997.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z. Naturforschung*, **61**, 19-25, 2006.

SANCHO, G.; FUNK, V.A.; ROQUE, N. *Moquiniastrum* (Gochnatieae, Asteraceae): disentangling the paraphyletic Gochnatia. *Phytotaxa*, **147**, 26-34, 2013.

SANCHO, G.; ROQUE, N. *Gochnatia*. In: *Lista de espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>, acesso em 07/07/2014.

SCHLEMPER, V.; FREITAS, S. A.; SCHLEMPER, S. R. M. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* in the guinea pig ileum. *Res. J. Med. Plant.*, **5**, 288-294, 2011.

SCOTTI, M. T.; FERNANDES, M. B.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 2927-2934, 2007.

SILVA, L. B.; STRAPASSON, R. L. B.; RIVA, D.; SALVADOR, M.J.; STEFANELLO, M. E. A. 2011. Triterpenes from the flowers of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **21** (3), 556-559, 2011.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Quim. Nova*, **21**, 702-704, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação de indústria com a academia. *Rev. Bras. Farmacog.*, **12**, 35-40, 2002.

SKEHAN, P.; STORENG, R; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, D. V.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107, 1990.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*, 2 nd ed., Wiley-Interscience, New York, 1997.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *J. Chromatogr. A*, **721**, 3-14, 1996.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M; AYRES, M.C.C; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO D.S., CAVALCANTE, L.C.D; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, **30**, 351-355, 2007.

STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A. e SIMIONATTO, E.L. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabr. ssp. *floccosa* Cabr.. *Quim. Nova*, **29**, 999-1002, 2006^a.

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**, 525-530, 2006^b.

STRAPASSON, R. L. B. *Estudo químico e farmacológico das cascas do tronco de Gochnatia polymorpha ssp. floccosa (Asteraceae)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2010.

STRAPASSON, R. L. B.; CERVI, A. C.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SALVADOR, M. J.; STEFANELLO, M. E. A. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpene lactones of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. *Phytother. Res.*, **26**, 1053-1056, 2012.

TOMASSINI, T. C. B.; GILBERT, B. α -Cyclocostunolide and dihydro- β -costunolide from *Moquinea velutina*. *Phytochemistry*, **11**, 1177-1179, 1972.

XIA, D.; DU, Y.; YI, Z.; SONG, H.; QIN, Y. Total syntheses of ainsliadimer B and gochnatiolides A and B. *Chem. Eur. J.*, S16-S19, 2013.

XIANG, M.; SU, H.; HU, J.; YAN, Y. Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. *J. Med. Plants Res.*, **5**, 1685-1691, 2011.

YUNES, A. R.; CECHINEL FILHO, V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*, 3ª Edição - revista e ampliada, Itajaí, 2012.

ZHANG, L.; SHAO, Y.; HUA, L.; HUSSAIN, S. H.; ARFAN, M.; GAO, K. Guaianolides and elemanolides from *Vernonia anthelmintica*. *Phytochem. Lett.*, **7**, 14-18, 2014.

ZHANG, S.; ONG, C.; SHEN, H. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem.*, **5**, 239-249, 2005.

ZHU, Y.; HU, P.-Z.; He, Z.-W.; Wu, Q.-X.; Li, J.; Wu, W.-S. Sesquiterpene lactones from *Scorzonera austriaca*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 237-241, 2010.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR R.L. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037, 2004.